



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA APLICADA

“Control Microbiológico en variedades de hierbas para infusión (Menta, Manzanilla, Boldo y Cedrón) de diferente origen y tratamiento desinfectante aplicado”

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA EN ALIMENTOS

José Romero Reyes
Patrocinante
Químico (UCH)

Luis López Valladares
Director
Químico Farmacéutico (UCH)

Estivalia Romina Zschau Montenegro

Santiago, Chile

2018

***“No pienses que no pasa nada, simplemente porque no ves tu crecimiento...
...las grandes cosas crecen en silencio”***

***“Lo que eres es lo que has sido
Lo que serás es lo que haces a partir de ahora”***

Buda

Agradecimientos

Deseo comenzar agradeciendo a todas aquellas personas que estuvieron presentes en el desarrollo de esta tesis, principalmente a las personas más importantes de mi vida, mi familia, comenzando por mi madre Marisol quien estuvo y ha estado siempre a mi lado, siendo mi respaldo más importante a lo largo de toda la carrera, apoyándome, empujándome y enseñándome constantemente a aprender de los errores y que nada es tan terrible como uno imagina. Además, agradezco a mi padre Alain, por su gran bondad, ternura y preocupación constante.

Agradezco a mi novio Axel, por su cariño y apoyo en todo momento, además de aportarme con su sabiduría y experiencia en los momentos de la carrera que más lo necesité.

Agradezco a mi profesor director de Tesis, Profesor Luis López Valladares, quien me orientó, enseñó y brindó su apoyo y compromiso constantemente, además de financiar la materia prima utilizada en esta investigación. También agradezco al profesor José Romero Reyes, quien supervisó día a día mi trabajo, ayudándome a resolver dudas constantemente, facilitándome varias hierbas para el desarrollo de este estudio.

Deseo dar las gracias a Don Óscar Vega, técnico del Laboratorio de Microbiología Aplicada, quien tuvo muy buena disposición y compromiso, ayudándome en cada momento que lo necesité. Además quiero agradecer a Don Carlos y Don Sergio, técnicos del Laboratorio de Procesos, quienes estuvieron presentes con su cariño, disposición y apoyo a través del transcurso de mi carrera y las ayudantías que realicé.

Finalmente agradezco a la vida, al destino y al universo, por haberme encaminado al ingreso a esta fascinante y aún poco reconocida carrera, a la cual debo mi crecimiento profesional, personal y humano. Lo que me ha llevado a experimentar un sinnúmero de valiosas experiencias, como vivir el emocionante término de este gran ciclo.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINAS
Resumen	1
Summary	2
1. Introducción	3
2. Marco Teórico	4
2.1 Definiciones	4
2.2 Formas de administración de las plantas	5
2.3 Antecedentes generales de las hierbas	6
2.4 Mercado y su situación en Chile	10
2.5 Reglamentación Nacional e Internacional	14
2.6 Requisitos de Importación/Exportación de hierbas para infusión	18
2.7 Procesos aplicados a hierbas para infusión	19
2.8 Tratamientos para la reducción microbiana en hierbas	21
3. Hipótesis y Objetivos	24
3.1 Hipótesis	24
3.2 Objetivo General	24
3.3 Objetivos Específicos	24
4. Materiales y métodos	25
4.1 Materiales	25
4.2 Metodología	26
4.3 Métodos	29
5. Resultados y Discusión	31

5.1 Determinación del contenido de microorganismos aerobios mesófilos (RAM) y enterobacterias presentes en muestras de hierbas, en estado deshidratado e infusión.	31
5.2 Verificación y determinación del cumplimiento de la Legislación vigente, en el contenido microbiológico en hierbas para infusión.	36
5.3 Comparación del contenido microbiano en tipos de hierbas de distintas marcas.	38
5.4 Análisis en relación a las características inherentes al tipo de hierba.	43
5.5 Comparación del contenido microbiano en diferentes condiciones de análisis.	47
5.6 Análisis del contenido microbiano en hierbas para infusión, en diferentes condiciones de análisis (muestra deshidratada e infusión)	49
5.7 Comparación y análisis de resultados obtenidos para hierbas tratadas con energía ionizante y aquellas tratadas con óxido de etileno.	53
5.8 Análisis y comparación de resultados microbiológicos, considerando el origen y forma de comercialización del producto.	56
6. Conclusiones	61
7. Bibliografía	63
8. Anexos	69

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINAS
Tabla 1: Empresas importadoras de té en Chile.	11
Tabla 2: Criterios microbiológicos para té y hierbas para infusiones.	14
Tabla 3: Especificaciones microbiológicas en Té y hierbas para infusión. Reglamento Técnico Centroamericano.	16
Tabla 4: Especificaciones microbiológicas en Hierbas para Infusión.	16
Tabla 5: Especificaciones Microbiológicas en especias, hierbas e infusiones. Legislado en España.	17
Tabla 6: Compendio de resultados de análisis realizados a hierbas para infusiones de distinta marca, en condición deshidratada e infusión.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINAS
Figura 1: Consumo mundial per cápita de té (libras).	10
Figura 2: Resultados de calidad microbiológica de hierbas Marca A.	31
Figura 3: Resultados de calidad microbiológica de hierbas Marca B.	32
Figura 4: Resultados de calidad microbiológica de hierbas Marca C.	34
Figura 5: Resultados de calidad microbiológica de hierbas Marca D.	35
Figura 6: Hierba menta deshidratada y en infusión, variedad de marcas.	38
Figura 7: Hierba manzanilla deshidratada y en infusión, variedad de marcas.	39
Figura 8: Hierba boldo deshidratada y en infusión, variedad de marcas.	41
Figura 9: Hierba cedrón deshidratada y en infusión, variedad de marcas.	42
Figura 10: Contenido aerobios mesófilos en variedad de hierbas en condición deshidratada e infusión.	47
Figura 11: Contenido enterobacterias en variedad de hierbas en condición deshidratada e infusión.	48

Resumen

Muchos países han establecido directrices, normas, reglamentaciones y sistemas que aseguren la provisión de alimentos inocuos y aptos para el consumo humano. Sin embargo, aún siguen habiendo alimentos que no son fiscalizados y son adquiridos en mercados informales, sin considerar los factores de proceso, tratamiento de reducción microbiana aplicado, origen de expendio, etc. Debido a ello se realizó un control microbiológico en hierbas para infusión (menta, manzanilla, boldo y cedrón), ampliamente reconocidas y consumidas en Chile, en las cuales se analizó y comparó la procedencia (mercado establecido/mercado ambulante), el tratamiento empleado para reducir la carga microbiana, la condición de la muestra para su análisis (hierba deshidratada e infusión) y la presentación comercial (envases individuales y expendio a granel). Además, se verificó el cumplimiento de la Legislación vigente (Nacional e Internacional) en relación al contenido de aerobios mesófilos y enterobacterias presente en las hierbas.

Del total de muestras analizadas, aquellas que no cumplieron con la Legislación vigente en el contenido de enterobacterias fueron la hierba menta, manzanilla y cedrón, en estado deshidratado Marca C, y también la hierba menta, manzanilla y cedrón en estado deshidratado Marca D, debido a que superaron el contenido máximo permitido (10^3 UFC/g). Respecto al contenido de bacterias aerobias mesófilas, todas las hierbas cumplieron con lo exigido por la Reglamentación, obteniendo valores inferiores a 10^6 y 10^7 UFC/g. Además, dentro de los resultados se obtuvo que aquellas hierbas con mayor contaminación de aerobios mesófilos, fueron la menta en estado de infusión Marca C y D ($3,8 \times 10^5$ UFC/g y $3,1 \times 10^5$ UFC/g respectivamente). En relación al contenido de enterobacterias, las que presentaron mayor contenido fueron hierba menta deshidratada Marca C ($1,2 \times 10^5$ UFC/g) y cedrón deshidratado Marca D ($6,9 \times 10^4$ UFC/g).

También se determinó, que factores como la aplicación de un tratamiento de desinfección, el tipo de hierba en particular, el origen y comercialización del producto, infieren evidentemente en el contenido microbiano en las hierbas estudiadas.

Summary

Microbiological control in herbs varieties for infusion (mint, chamomile, boldo and cedron) of different origin and disinfectant treatment applied

Many countries have established guidelines, standards, regulations and systems that ensure the provision of safe food suitable for human consumption. However, there are still foods that are not audited and are acquired in informal markets, without considering the process factors, applied microbial reduction treatment, origin of sale, etc. Due to this, a microbiological control was carried out on infusion herbs (mint, chamomile, boldo and cedron), widely recognized and consumed in Chile, which the origin was analyzed and compared (established market / street market), the treatment used to reduce the microbial load, the condition of the sample for its analysis (dehydrated herb and infusion) and the commercial presentation (individual packages and bulk sale). In addition, compliance with the current Legislation (National and International) was verified in relation to the content of mesophilic aerobes and enterobacteria present in the herbs.

Of the total samples analyzed, those that did not comply with the legislation valid in the content of enterobacteria were mint, chamomile, cedron, dehydrated Brand C, and also the herb mint, chamomile and cedron in dehydrated state Brand D, because they exceeded the maximum allowed content (10^3 CFU/g). Regarding the content of mesophilic aerobic bacteria, all the herbs complied with the requirements of the Regulation, obtaining values lower than 10^6 and 10^7 CFU/g. In addition, within the results it was obtained that those herbs with higher mesophilic aerobic contamination, were mint infused Brand C and D ($3,8 \times 10^5$ CFU/g and $3,1 \times 10^5$ CFU/g respectively). In relation to the content of enterobacteria, the ones with the highest content were dehydrated herb mint Brand C ($1,2 \times 10^5$ CFU/g) and dehydrated cedron Brand D ($6,9 \times 10^4$ CFU/g).

It was also determined that factors such as the application of a disinfection treatment, the type of herb in particular, the origin and commercialization of the product, evidently inferred in the microbial content in the herbs studied.

1. Introducción

Históricamente el consumo de hierbas para infusión está profundamente arraigado en las costumbres de la población chilena, cuyo mercado se ha desarrollado y potenciado más durante los últimos años. Tal vez, uno de los factores que explica este consumo se encuentre en la generalizada opinión de que los principios activos contenidos en estas hierbas contribuyen de manera importante a mejorar determinadas afecciones o, por lo menos, tienden a aliviarlas (SERNAC, 2002).

Un problema de salud actual son las enfermedades transmitidas por los alimentos o comúnmente llamadas ETA, en donde cada día se reportan brotes que afectan a numerosas personas, los que son causados por agentes de tipo biológico, químico o físicos que contaminan los alimentos, algunos de ellos emergentes y otros desconocidos, desafiando permanentemente a los países en sus políticas de salud pública y a la cadena de producción de alimentos respecto de las medidas de control que deben adoptar (Ulloa, 2016).

Es por ello que el control microbiológico rutinario de alimentos destinados al consumo humano está tomando cada vez más relevancia. Con el objeto de brindar un producto más seguro para la salud del consumidor, es preciso realizar estos controles en el producto, ya sea antes, durante o después de su elaboración, para establecer los criterios microbiológicos y asegurar la inocuidad del producto. De esta manera, las empresas procesadoras de alimentos realizan análisis microbiológicos que aportan indicios del producto y de su inocuidad e idoneidad para ser aptos para el consumo humano (Nore y Sánchez, 2008).

En base a estas consideraciones, el presente estudio tiene como objetivo realizar un control microbiológico en hierbas para infusión (menta, manzanilla, boldo y cedrón) ampliamente consumidas y reconocidas en Chile, siendo expuestas a diferentes tratamientos desinfectantes y adquiridas de distintos lugares de comercialización y formas de presentación (mercado establecido y comercio ambulante/bolsitas y expendio a granel).

2. Marco Teórico

2.1 Definiciones

Definir si una planta se debe considerar como aromática, medicinal o condimentaria, puede resultar claro en algunas plantas medicinales, pero en la mayoría de los casos su clasificación puede resultar dificultosa y conflictiva, ya que en muchas ocasiones se entremezclan estos conceptos (Esteve, 2003).

La definición de cada una de éstas se expone a continuación.

2.1.1 Plantas medicinales. Aquellas que en algunos de sus órganos poseen unos productos químicos llamados principios activos, los cuales ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial sobre el organismo vivo, siendo capaces de prevenir, aliviar y tratar una enfermedad (Muñoz, 2002).

2.1.2 Plantas aromáticas. Son aquellas cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente por aceites esenciales que le confieren a la planta, a sus extractos o a los productos con los que se mezcle, un aroma agradable al olfato (Esteve, 2003).

De acuerdo al artículo 459 del Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA), las hierbas aromáticas comprende ciertas plantas o partes de ellas (raíces, rizomas, bulbos, hojas, cortezas, flores, frutos y semillas) que contienen sustancias aromáticas y que por sus sabores característicos, se destinan a la preparación de infusiones de agrado (RSA, 2011).

2.1.3 Plantas condimentarias. En este caso se considera a una planta alimenticia o condimentaria, cuando sus principios nutritivos o características organolépticas (sabor, olor, color), sirven de alimento al organismo humano y animal, o de transmitir a bebidas o alimentos ciertos sabores, aromas o colores que los haga más gratos y apetitosos al olfato, vista y paladar (Esteve, 2003). En esta categoría entran las especias y hierbas comestibles desecadas, las cuales poseen componentes, fragantes, aromáticos o pungentes, que se utilizan para mejorar aroma, color y

condimentar alimentos, tanto de forma entera, quebrada o molida (Codex Alimentarius, 1995).

2.2 Formas de administración de las plantas

Las tisanas constituyen probablemente la forma de administración líquida más simple y popular de preparar las plantas medicinales. Son el resultado de la acción del agua sobre los productos vegetales. Para prepararlas se suele recurrir a uno de los siguientes procesos extractivos: infusión, decocción y maceración (López, 2002).

La infusión es el procedimiento más adecuado para obtener tisanas de las partes delicadas de las plantas: hojas, flores, sumidades y tallos tiernos, ya que con ella se extrae suficiente cantidad de sustancias activas de la hierba, con muy poca alteración de su estructura química, ya que se minimiza el efecto destructivo del calor sobre éstas (Pamplona, 2006). Para prepararla, se vierte la hierba en el agua caliente hasta el punto de ebullición, tapando y dejando en maceración durante unos 3-5 min. Después se cuela y la solución resultante se consume enseguida, preferiblemente caliente (**Anexo 1**).

Las infusiones se utilizan tanto por vía interna (consumo oral) como por vía externa (aplicación sobre la piel, en forma de lavado, baños o cataplasmas) (López, 2002).

La decocción se utiliza para preparar tisanas a base de partes duras de las plantas (raíces, cortezas, semillas), que precisan de una ebullición mantenida para liberar sus principios activos. Sin embargo, presenta el inconveniente de que algunos de los principios activos pueden degradarse por la acción prolongada del calor. Ésta se prepara vertiendo la cantidad adecuada de la hierba en un recipiente con el agua caliente al punto de ebullición, y se deja hervir durante un tiempo que oscila entre 2 y 5 min. Después se apaga el fuego y se deja en maceración durante 15 min. El líquido resultante se cuela y se consume rápidamente, preferiblemente caliente.

Al igual que las infusiones, las decocciones se pueden utilizar tanto por vía interna como externa (López, 2002).

La maceración resulta útil para aquellas hierbas cuyos principios activos sean termolábiles. A veces se realiza primeramente una maceración para reblandecer los tejidos vegetales y, seguidamente, una decocción. Por lo general, si se trata de partes blandas (como flores y hojas) el tiempo de maceración será de unas 12 h y, si son partes duras (como raíces y cortezas) será de 24 h. Ésta se prepara colocando la droga previamente pesada en un recipiente opaco con la cantidad de agua necesaria a temperatura ambiente. Se deja reposar en un lugar fresco y oscuro el tiempo requerido (López, 2002).

2.3 Antecedentes generales de las hierbas

A continuación, se expondrán características inherentes a las hierbas utilizadas en este estudio (Véase **Anexo 2**).

Menta (*Mentha piperita*)

Nombres comunes: menta, menta piperita, hierbabuena, yerbabuena.

Familia: *Lamiaceae*.

Descripción: es una planta herbácea, de color verde, de 20 - 100 cm de alto, erecta y lisa muy ramificada con tallos erguidos, hojas opuestas ovaladas, un tanto aserradas y pubescentes muy aromáticas.

Aspectos agronómicos: la menta es una planta originaria de las zonas templadas de Europa, África del Norte y China, y asilvestrada y cultivada en grandes cantidades en todo el mundo. Se reproduce a través de estolones y plantines; puede crecer ya sea en forma espontánea o en terrenos baldíos, escombros, suelos ricos, húmedos, bien drenados y soleados, en zonas de clima templado con elevada luminosidad (Vega, 2014).

Propiedades y usos tradicionales: se emplea para tratar desórdenes digestivos. Posee efectos carminativo (previene y favorece la expulsión de gases), antiespasmódico (calma los retortijones estomacales) y antiflatulento, para aliviar dolores de estómago, náuseas, fiebre, dolor de cabeza y mal aliento. Se usa para aliviar la congestión nasal, problemas respiratorios, calmar palpitaciones cardiacas, diarreas y expulsar cálculos biliares. De las hojas se obtiene un aceite esencial

usado en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética como agente saborizante y aromatizante por su alto contenido en mentol, principal responsable del agradable aroma y de la actividad terapéutica de esta planta (MHT, 2009).

Precauciones: no se debe administrar a niños menores de 2 años y a mujeres gestantes o que estén en época de lactancia (puede reducir el flujo de leche). Se debe tener cuidado en personas que tomen medicamentos para la gastritis. Su uso en exceso puede causar intoxicaciones (Vega, 2014).

Manzanilla (*Chamaemelum nobile*)

Nombres comunes: Manzanilla, manzanilla común, manzanilla de Aragón, manzanilla dulce, camomila.

Familia: *Asteraceae*.

Descripción: la manzanilla es una hierba de tallo erecto, que crece hasta 50 cm de altura; las hojas son alternas y bipinnatisectas de color verde claro y muy aromáticas. Las ramas terminan en capítulos con un botón en el centro (flores) de color amarillo, y una corona de brácteas en forma de lengüetas de color blanco.

Aspectos agronómicos: la manzanilla crece en terrenos templados y relativamente áridos; requiere agua para germinar. Se propaga por semillas; primero se siembra en almácigos de tierra rica en humus y las plántulas se trasplantan luego de 6 semanas (MHT, 2009).

Propiedades

Usos tradicionales:

a) uso interno: trastornos digestivos (dolor de estómago, indigestión, digestiones difíciles de tipo crónico (dispepsia), cólicos, flatulencia, diarreas); afecciones de las vías urinarias (cistitis o inflamación de la vejiga); dolores menstruales; insomnio (MHT, 2009).

b) uso externo: heridas superficiales, contusiones, picaduras de insectos; irritaciones e infecciones en la boca; ojos irritados; cólicos abdominales; hemorroides. Se usa la misma infusión como gargarismos y para lavar y descongestionar los ojos. En hemorroides se usa primero como vahos de asiento

(cuando la infusión está caliente) y luego en baños de asiento (cuando la temperatura es tolerable sin quemarse) (MHT, 2009).

Efectos: antibacteriano (mata las bacterias o impide su desarrollo), antiespasmódico (calma los retortijones estomacales), diurético (promueve y aumenta la producción de orina) suave, carminativo (previene y favorece la expulsión de gases), anti-inflamatorio, cicatrizante (MINSAL, 2012).

Precauciones: almacenar en envases bien cerrados y protegidos de la luz. Evitar su preparación en utensilios de aluminio (MHT, 2009). Las personas alérgicas a esta planta deben abstenerse de consumirla (Vega, 2014).

Boldo (*Peumus boldus*)

Nombres comunes: boldo, boldea, limoncillo, boldo de Chile.

Familia: *Monimiaceae*.

Descripción: árbol o arbusto dioico, de hasta 20 m de altura, tronco corto con copa redondeada y frondosa, muy aromático. Hojas siempre verdes de 3-7 cm de largo por 1-5 cm de ancho, subsésiles, opuestas, coriáceas, enteras, aovadas u oblongas. Flores de 5-10 mm de diámetro. Fruto en drupa desnuda en el fondo del perigonio caduco, 5-7 mm de largo, carnoso, comestible y muy dulce cuando está maduro.

Aspectos agronómicos: el boldo es un árbol endémico de Chile; se le encuentra entre las provincias de Limarí (IV Región) y Osorno (X Región). Crece en diversas condiciones, bien adaptado a lugares de poca humedad y suelos pedregosos. Florece de junio a agosto y sus frutos maduran entre diciembre y enero (MHT, 2009).

Propiedades

Usos tradicionales:

a) uso interno: molestias gastrointestinales y digestiones difíciles de tipo crónico (dispepsias), laxante suave; protector hepático y sedante nervioso (MHT, 2009). Es útil en caso de intoxicaciones estomacales. Sirve para aliviar el estreñimiento (Vega, 2014).

b) uso externo: La infusión puede ser utilizada en baños y cataplasmas para aliviar dolores reumáticos y neurálgicos.

Efectos: laxante suave, anti-inflamatorio, protector hepático, digestivo.

Precauciones: no usar en caso de obstrucción de la vía biliar (ictericia). No se recomienda su administración oral durante el embarazo o en período de lactancia, ni en niños menores de 10 años. No usar por periodos prolongados de tiempo ni infusiones demasiado concentradas. En pacientes con cálculos renales usar sólo bajo vigilancia médica. La ingesta de dosis muy elevadas actúa como somnífero y anestésico sobre el sistema nervioso central (Pamplona, 2006).

Cedrón (*Aloysia citrodora*)

Nombres comunes: cedrón, cidrón, hierba Luisa, verbena olorosa, verbena de indias.

Familia: *Verbenaceae*

Descripción: arbusto 3 - 3,5 m de altura, tallo leñoso. Hojas angostas y alargadas, ásperas, delgadas, de 5 - 10 cm de largo, de olor agridulce muy característico, que se caen en otoño. Flores pequeñas, blancas o violeta pálido, dispuestas por lo general en espigas terminales.

Aspectos agronómicos: Interés agronómico: planta originaria de Sudamérica, crece de forma silvestre en suelos ligeros y bien drenados, en clima templado a templado cálido; resiste bastante bien las heladas.

Propiedades

Usos tradicionales: en trastornos digestivos (diarrea, cólicos, dispepsia, indigestión, náusea, vómitos y flatulencia); en trastornos del sistema nervioso (insomnio y ansiedad); en estados gripales (resfriados con fiebre) (MHT, 2009).

Precauciones: no administrar por un periodo prolongado de tiempo ni infusiones muy concentradas. Las mujeres deben usarlo con moderación durante la gestación (MINSAL, 2012).

2.4. Mercado y su situación en Chile

2.4.1 Estadísticas y Productos de consumo

En términos generales, en Chile se consumen 517 tazas de bebidas calientes per cápita al año. Este mercado mueve anualmente en Chile US\$385 millones y es controlado por tres grandes grupos: Nestlé (con una participación de 37,7%), Unilever (con 22,3%) y Cambiaso Hermanos (con 19,7%). Para la canasta de bebidas calientes (que incluye Té, Café, Hierbas y Mate), el canal más importante de distribución es el de los supermercados, que concentra un 84,0% de las ventas, mientras que en los almacenes tradicionales se vende sólo un 16% del total. Anteriormente, la categoría más importante de la canasta de bebidas calientes en Chile era la del café, con un 52,6% de las ventas, siguiéndole el té con 42,7%, más atrás se ubicaban las hierbas (2,7%) y finalmente el mate (2,1%) (ICEX, 2009). Actualmente se ha revertido esta situación, aumentando el consumo de té por sobre el café. De acuerdo a datos estadísticos (**Anexo 3**), dentro del país se consumen cerca de 730 g (1,61 libras) de té por persona, es decir, 1 bolsa de té diario, posicionándolo entre los 15 países de mayor consumo per cápita a nivel mundial y el número 1 en Latino América (Rojas, 2016) como se puede apreciar en la **figura 1**.

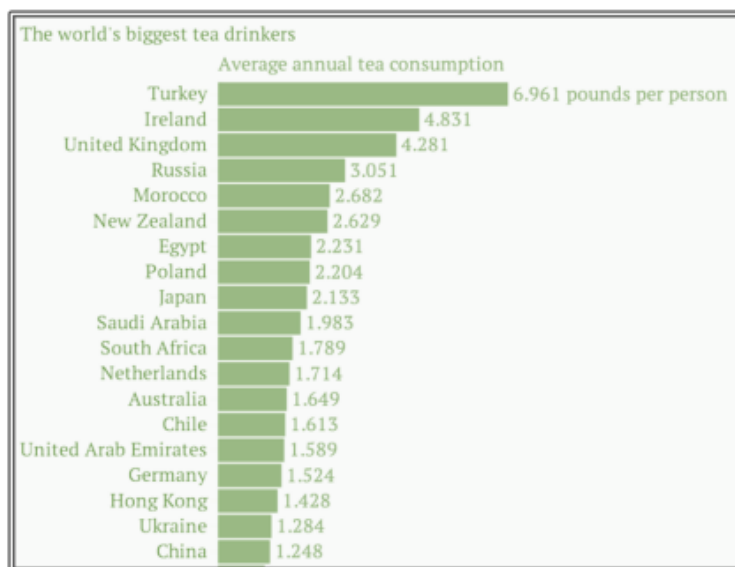


Figura 1: Consumo mundial per cápita de té (libras)

Fuente: (Rojas, 2016)

El té comercializado por las principales empresas dentro del territorio nacional, es importado. En la **tabla 1** se observan las empresas importadoras de té en Chile y su porcentaje de participación en el mercado. Sin embargo, no se consideran las ventas totales, ya que también se produce té en territorio chileno (Rojas, 2016).

Tabla 1: Empresas importadoras de té en Chile.

Empresa Importadora	Monto de 2015 (US\$)	% Participación en el mercado	Marcas
Unilever Chile SCC Ltda.	14,131,263	26.9	Lipton, Té Club
Tresmontes SA.	7,720,395	14.7	Té Orjas
Comercial FH Engel SA.	1,488,793	2.8	Twinings
Pibamour Ltda.	1,373,327	2.6	Dilmah
Velarde Hermanos SA.	782,130	1.5	Fujian
Otros.	27,084,390	51.5	Té Supremo, Mildred, etc.

Fuente: (Rojas, 2016)

En cuanto a las infusiones, su consumo viene creciendo fuertemente debido al reconocimiento de los consumidores de las propiedades beneficiosas para su salud, es por esto que cada día va en aumento el consumo de té, hierbas o mate. En la actualidad se han ido masificando los té verde, los aromatizados y las combinaciones de té, hierbas y frutas, debido a una tendencia mundial enfocada en el bienestar, lo que ha sido un gran cambio versus los tradicionales té negros que usualmente dominaban el mercado (ICEX, 2009).

2.4.2. Mercado Nacional Hierbas Aromáticas

En cuanto al mercado interno, existe una demanda permanente de productos en base a plantas medicinales y aromáticas, de buena calidad, que se encuentra asociada a la industria farmacéutica, cosmética, laboratorios homeopáticos, elaboración de bolsitas de infusiones (tés) y usos en la medicina complementaria, en la cual laboratorios farmacéuticos tradicionales han incorporado en los últimos años nuevas líneas de productos naturales. Otra línea de demanda la constituye la industrialización con el fin de obtener extractos y aceites esenciales, los cuales

carecen de un mercado estable y sólo abarcan ciertas especies, las que varía año tras año dependiendo de la demanda (FIA, 2008).

Existe también un mercado informal, en el que participan recolectores y yerbateros con productos de calidad irregular, quienes comercializan con algún grado de agregación de valor (como el envasado artesanal) en ferias, kioscos, mercados locales, puestos callejeros o almacenes como hierberías (FIA, 2008).

Sin embargo, el mercado nacional de plantas medicinales se caracteriza por un consumo interno muy bajo, que no alcanza a US\$ 5 per cápita por año, en comparación a consumos sobre US\$ 30 per cápita/año en Europa (FIA, 2008).

La oferta de materia prima proviene principalmente de la recolección de material silvestre, debido a ello no existen estadísticas que permitan conocer la superficie existente en estado natural de cada especie y su productividad, tampoco existe información del volumen transado en el mercado informal (FIA, 2008).

No obstante, en Chile existen cultivos establecidos de plantas medicinales y aromáticas, principalmente destinados al mercado culinario y a cultivos desarrollados por empresas que están verticalmente integradas, donde el cultivo de estas especies abastece de materia prima para la elaboración de otros productos (FIA, 2008).

2.4.3. Industria Nacional

Tradicionalmente, la oferta nacional de productos a partir de plantas medicinales y especias se ha caracterizado por tener un reducido valor agregado, debido a un bajo nivel de procesamiento, siendo usado principalmente el deshidratado como proceso para plantas medicinales orientadas al mercado externo e interno, como también la extracción de aceites, aunque esto último en mucho menor volumen (FIA, 2008).

En Chile existen algunas industrias establecidas que procesan varias especies de plantas medicinales y aromáticas, principalmente para infusiones y especias tradicionales. Estas industrias cuentan con la tecnología para el proceso de secado de estas especies y también tienen experiencia como exportadoras en este rubro. La mayor parte de la materia prima que utilizan proviene de la recolección de especies silvestres, una actividad que se encuentra establecida y que es fuente de ingresos de

pequeños agricultores. En el corto y mediano plazo, no se prevé el reemplazo de este tipo de recolección de material vegetal por el abastecimiento formal desde cultivos establecidos de las mismas especies.

En lo que respecta al mercado de exportación, éste es dominado por laboratorios y empresas envasadoras de infusiones, que abastecen el mercado externo con productos de alta tecnología, como aceites, sachets de hierbas, cápsulas y material prensado con certificación de calidad (FIA, 2008).

Entre las empresas chilenas que comercializan plantas medicinales a escala industrial se encuentran la Sociedad Agrícola y Forestal Casino, que ha exportado rosa mosqueta y hierba de San Juan; Cambiaso Hermanos S.A.C. y Frigosam S.A., que exportan y comercializan material seco para té de hierbas en bolsitas; Index Salus, que se dedica al cultivo orgánico y procesamiento en seco de plantas medicinales y aromáticas, y Coesam, exportador de aceite de rosa mosqueta (FIA, 2008).

2.4.4 Formas de Consumo y características del Producto

Generalmente, las infusiones para venta al retail son envasadas en cajas de 10, 20 y 100 bolsitas con un contenido individual de aproximadamente 1 g. También se venden en latas de 100 y 200 g, o en paquetes de 50 y 100 g con el producto a granel en su interior. Los supermercados venden las infusiones en bolsitas o a granel, para consumo en el hogar. En las tiendas especializadas se suele vender infusiones de alta calidad como orgánicas, combinaciones o especies poco comunes (ProChile, 2011).

Las infusiones, se consumen de forma fría o caliente, siendo en mayor medida su consumo en caliente, utilizando agua hirviendo y dejándolo reposar un tiempo determinado, especificado en el envase del producto.

Comúnmente, los momentos de consumo son en el desayuno, almuerzo o cena, incrementando su consumo en los meses invernales. El motivo de consumo es variable, algunas personas consumen las infusiones por motivos medicinales (afecciones físicas) o como complemento a una dieta saludable (ProChile, 2011).

2.4.5 Canales de Comercialización y Distribución

Una de las formas de ingreso de las hierbas a Chile es en grandes cantidades a granel, las cuales van destinadas a las compañías procesadora con el objeto de envasarlas en bolsitas de 1 g o paquetes de 50 g, 100 g, etc. Generalmente, la industria procesadora adquiere sus productos directamente desde el importador o mayorista. La otra vía es importar en paquetes con bolsitas, previamente envasados en origen o latas con el producto a granel en su interior (ProChile, 2011).

2.5 Reglamentación Nacional e Internacional

2.5.1 Legislación Nacional

En Chile, el Reglamento Sanitario de los Alimentos establece las condiciones sanitarias a las que debe ceñirse la producción, importación, elaboración, envasado, almacenamiento, distribución y venta de alimentos para uso humano, con el objeto de proteger la salud y nutrición de la población y garantizar el suministro de alimentos sanos e inocuos.

El organismo que se encarga de regular y fiscalizar los alimentos es el Ministerio de Salud (MINSAL) basándose en el contenido del RSA para cumplir con la legislación vigente.

En relación a la especificación de los límites microbiológicos permitidos para alimentos, se consideró la exigencia contenida en este reglamento, en donde en el artículo 173, punto 17.2, el RSA establece límites máximos permitidos para hierbas para infusión, específicamente en lo referente al contenido de enterobacterias (**Tabla 2**). Sin embargo, se debe considerar que no queda claro en esta disposición, si los límites establecidos se refieren al producto deshidratado o a la infusión propiamente tal.

Tabla 2. Criterios microbiológicos para té y hierbas para infusiones.

17.2.- TE Y HIERBAS PARA INFUSIONES							
Parámetro	Plan de muestreo		n	Límite por gramo			M
	Categoría	Clases		c	m	M	
Enterobacteriaceas	5	3	5	2	10 ²	10 ³	

Debido a que el RSA no contiene otras especificaciones microbiológicas para este tipo de producto, se establecerá como patrón de referencia las especificadas por la Legislación Argentina, la cual establece como contenidos límites para bacterias aerobias mesófilas de 10^7 UFC/g (C.A.A, 2010).

2.5.2 Legislación Internacional

La normativa vigente en la Unión Europea relativa a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, se rige por el Reglamento (CE) 2073/2005. En éste se detallan los criterios de seguridad alimentaria para varios alimentos. Sin embargo, no se encontró la especificación para infusiones, especies o hierbas aromáticas, ni tampoco para algún producto de esta categoría.

Asimismo, en las “Especificaciones de Mínimos de Calidad para Hierbas y Especies” de la Asociación Europea para las Especies, se menciona en el tópico de microbiología, que no deben aparecer microorganismos en el producto en niveles que puedan representar un peligro para la salud, sin ninguna otra especificación de relevancia.

Por otro lado, en el Real Decreto 1354/83 de la Unión Europea se propone el perfil microbiológico para té y derivados, en éste se establecen los siguientes límites:

Aerobios mesófilos: 10^6 UFC/g

Mohos y levaduras: 10^4 UFC/g

Escherichia coli: 10 en 1 g

Salmonella: ausencia en 25 g

Shigella: ausencia en 25 g

Bacillus cereus: 10^3 UFC/g (BOE, 1983)

En el Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias del Codex Alimentarius, se establecen los criterios microbiológicos para especies y plantas aromáticas listas para el consumo, la cuales deben estar exentas de *Salmonella* cuando se analicen con métodos de examen apropiados de diez muestras de 25 g (n=10, c=0) (Codex Alimentarius, 1995).

De acuerdo al Reglamento Técnico Centroamericano, los criterios microbiológicos para hierbas para infusión se exponen a continuación.

Tabla 3. Especificaciones microbiológicas en Té y hierbas para infusión. Reglamento Técnico Centroamericano.

14.5 Subgrupo del alimento: Té y hierbas para infusión						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3 NMP/ g	----
<i>Salmonella ssp/25 g</i>		2		0	Ausencia	----

Fuente: (RTCA, 2009)

Las especificaciones microbiológicas para alimentos, encontradas en la “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”, establecido por la Resolución Ministerial de Perú, se detallan a continuación.

Tabla 4. Especificaciones microbiológicas en Hierbas para Infusión.

17. ESTIMULANTES Y FRUITIVOS.						
17.1 Café y Sucedáneos de café						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
Mohos	3	3	5	1	10	10 ²
<i>Bacillus cereus</i> (*)	8	3	5	1	10 ²	10 ⁴
(*) Para sucedáneos de café						
17.2 Hierbas de uso alimentario para infusiones (té, mate, manzanilla, boldo, otros)						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
Mohos	3	3	5	1	10 ²	10 ³
<i>Enterobacteriaceas</i>	5	3	5	2	10 ²	10 ³

Fuente: (Norma Sanitaria Que Establece Los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para Los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano, 2003).

Es necesario mencionar que dicha norma sanitaria se establece en el marco del “Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanitario de Alimentos y Bebidas, aprobado por el Decreto Supremo N° 007.98 SA y en concordancia técnico normativa con los Principios para el establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos para los

Alimentos del Codex Alimentarius y con la clasificación y planes de muestreo de la International Commission on Microbiological Specification for Foods” (ICMSF).

En el caso de España, la legislación Vigente es regulada por lo establecido en el Reglamento de la Unión Europea y otras Legislaciones. Respecto a las especificaciones microbiológicas para hierbas de infusión, éstas se encontraron en las “Normas Microbiológicas de Los Alimentos y Asimilados (superficies, aguas diferentes de consumo, aire, subproductos) otros Parámetros Físico-Químicos de Interés Sanitario” (De Pablo y Moraga, 2017), lo cual se presenta a continuación.

Tabla 5. Especificaciones Microbiológicas en especias, hierbas e infusiones. Legislado en España.

Alimentos	Legislación o Recomendación	Aerobios Mesófilos	Enterobacterias Coliformes	E. coli	S. aureus	Salmonella Shigella Mohos Listeria m. y otros	Otros límites. Comentarios.
Especies vegetales e infusiones uso alimentario	RD 3176/83 BOE 28/12/83						El Real Decreto no recoge normas microbiológicas.
	Reglamentos CE 2073/2005 y 1441/2007					<i>Listeria monocytogenes</i> n=5 c=0 100 ufc/g	Fase de aplicación del criterio, durante su vida útil. Se ha estimado que no pueden favorecer el crecimiento de <i>Listeria</i> por su $a_w \leq 0.92$. Véase la página 5.
Especias (Capsicum spp, Nuez moscada, otras especias y hierbas)	Recomendación Comisión UE 2004/24/CE		Enterobacterias n=5 c=1 m=10 M=100			Salmonella n=5 c=0 Ausencia / 25 g.	<i>Clostridium perfringens</i> n=5 c=1 m=100 M=1.000 <i>Bacillus cereus</i> n=5 c=1 m=1.000 M= 10.000 Criterios de control del programa de Control Oficial de productos alimenticios para el 2004 (Recomendación de la Comisión 2004/24/C; D.O.U.E. 10/1/04).

Fuente: (De Pablo y Moraga, 2017)

La OMS (1998) describe en “Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials”, parámetros microbiológicos para plantas medicinales, los cuales son:

Recuento de aerobios mesófilos: máximo 10^7 /g.

Recuento de hongos y levaduras: máximo 10^4 /g.

Recuento de *Escherichia coli*: máximo 10^2 /g.

Salmonella: ausencia.

Adicionalmente, el MERCOSUR establece características microbiológicas para hierbas aromáticas deshidratadas, en la cual el producto deberá cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en las Resoluciones MERCOSUR o en la legislación nacional específica. En ausencia de ambas deberá cumplir con lo establecido en las Normas del Codex Alimentarius y/o Códigos o legislaciones Regionales y/o Norma Paraguaya y/o ICMSF.

2.6 Requisitos de Importación/Exportación de hierbas para infusión

2.6.1 Regulaciones de Importación y Normas de Ingreso

La importación de hierbas e infusiones está regida por las normas “Plant Protection Law”, “Foreign Trade Act” y “Food Sanitation Law”. Bajo las estipulaciones de esta última, se debe presentar el documento “Notification Form for Importation of Foods” junto con otros documentos requeridos a la Oficina de Cuarentena del puerto de entrada del producto. Según el resultado del examen de estos documentos, se determina la necesidad de una inspección sanitaria en el área correspondiente (ProChile, 2011).

Igualmente los productos en base a hierbas altamente procesadas que estén enlatados, embotellados o en envases cerrados y que no posean ningún tipo de riesgo de ingreso de plagas, enfermedad de plantas, u otras contaminaciones, están exentos de inspecciones de importación, sin embargo hay algunas excepciones (ProChile, 2011).

2.6.2 Requisitos para Importación

❖ Para Plantas Medicinales, Aromáticas y Biocidas

Para el comercio internacional las plantas medicinales, aromáticas y biocidas se identifican con el Código Arancelario 121190.

Para ejecutar el trámite de importación, se deben presentar, obtener y/o solicitar los siguientes documentos:

- Certificado fitosanitario emitido por una organización gubernamental del país exportador.
- Lista de empaque.
- Recibo de la vía aérea.
- Solicitud de inspección de importación de plantas y artículos prohibidos para importación (MIPRO, 2015).

Cuando se confirme, como resultado de la inspección, que los productos pertinentes no se incluyen en la categoría de artículos prohibidos a la importación y no se encuentren plagas sometidas a cuarentena vegetal, será emitido un certificado de inspección. Si se encuentra alguna plaga, los productos son rechazados, pero incluso en tales casos, estos pueden ser esterilizados (a expensas del importador), y se puede emitir un certificado de inspección después de haber realizado la esterilización (MIPRO, 2015).

❖ **Requisitos generales para importaciones a la Unión Europea**

- Aplicar y cumplir con GAP (Good Agricultural Practices) y GMP (Good Manufacturing Practices).
- Formulario arancelario.
- Copia de la factura o factura proforma.
- Adicionalmente tiene que existir para transporte de cantidades por encima de 50 kg en los Estados Unidos una “Hoja de Datos de Seguridad” (IICA, 1999).

2.6.3 Requisitos para Exportación

Para ejecutar el trámite de exportación, se deben presentar los siguientes documentos:

- Formulario de exportación y factura.
- Certificado fitosanitario emitido por una organización gubernamental del país exportador.
- Para productos orgánicos: copia del certificado orgánico
- Para especies silvestres: certificado CITES
- Adicionalmente, existen restricciones para plantas narcóticas y sus derivados (IICA, 1999).

2.7 Procesos aplicados a hierbas para infusión

En el mercado se encuentran tisanas de muchos tipos, en cuanto a forma de empaque a cantidades por paquete y a marcas, sin embargo predominan los empaques normales (en bolsa de té) y los paquetes de 20 unidades (Meneses, 2013).

La producción, elaboración y envasado de las especias y hierbas aromáticas desecadas es muy compleja. Las plantas (materia prima) de las que se originan las especias y hierbas aromáticas desecadas son cultivadas en una gran variedad de países y en muchos tipos distintos de granjas, las prácticas agrícolas varían ampliamente desde el uso de prácticas totalmente artesanales hasta aquellas altamente mecanizadas. El proceso de desecado de la materia prima vegetal puede ser realizado de manera mecánica (para un secado rápido) o naturalmente (por ejemplo, secado lento bajo el sol, por varios días). La distribución y cadena de elaboración para las especias y hierbas aromáticas desecadas es también altamente compleja y puede abarcar largos períodos de tiempo e incluir un amplio rango de establecimientos. Por ejemplo: las especias y hierbas aromáticas secas cultivadas en pequeñas explotaciones agrícolas pueden pasar a través de múltiples etapas de recolección y consolidación antes de llegar a un procesador y empacador de la especia o al elaborador de alimentos. El procesamiento de un producto desecado en general involucra: la limpieza (selección, eliminación de partículas no deseadas), clasificación, y algunas veces el remojado, corte, secado y en otras ocasiones la molienda o descascarado. Algunas especias y hierbas aromáticas desecadas también son sometidas a tratamientos para mitigar la contaminación microbiana, típicamente tratándolos con gas (por ej., óxido de etileno), o a través de irradiación. La elaboración y envasado o re-empacado también pudiera efectuarse en distintos lugares a lo largo de amplios periodos, ya que las especias y hierbas aromáticas desecadas se preparan para muchos propósitos distintos (Codex Alimentarius, 1995).

2.7.1 Descripción general del proceso

1.- La primera etapa es el cultivo, en la cual se prepara el terreno y se generan las condiciones óptimas para la siembra de las plantas aromáticas (retiro de la

vegetación existente, arado de tierra, análisis fisicoquímico y corrección del pH del suelo) (Meneses, 2013).

2.- Construcción de camas (consiste en aporcar la tierra y hacer los caminos), para la siembra de las semillas, o el trasplante desde un almácigo (Meneses, 2013).

3.- Luego que las hierbas han crecido se desmalezan, deshieran, podan, se aplican fertilizantes y agroquímicos para el control de plagas y enfermedades.

4.- Se realiza la cosecha, de manera manual o mecánica.

5.- Luego de que el producto (deshidratado o fresco) es transportado a la Planta de transformación, en la cual pasa por un proceso de recepción, donde se pesa e inspecciona y se realiza un análisis microbiológico de la materia prima.

6.- Posteriormente se lava y desinfecta (diferentes métodos de reducción microbiana), en tanques con sustancias especiales que garantizan la inocuidad de un producto para consumo humano. Si el producto se recibe fresco, se deshidrata en un horno de aire ascendente y si se recibe deshidratado se verifica el grado de humedad y se continúa con el proceso. En esta etapa puede realizarse una nueva inspección manual y eliminar el material no deseado.

8.- Se tritura el material con un molino y luego se introduce por un tamiz.

9.- Se realizan las mezclas de las hierbas aromáticas según el producto a ofrecer, generando una mezcla homogénea.

10.- El producto es dosificado, empacado y etiquetado en la maquina empacadora de hierbas. Se verifica que el producto final cumpla con los requisitos esperados.

12.- Se rotula el producto y se almacena para su posterior embarque, transporte y comercialización (Meneses, 2013).

2.8 Tratamientos para la reducción microbiana en hierbas

Para reducir el riesgo de producir una posible enfermedad transmitida por alimentos (ETA), las especias y hierbas aromáticas desecadas deben ser sometidas a un tratamiento válido de reducción microbiana, antes de estar a la disposición del consumidor, para así inactivar patógenos y cumplir con las normas establecidas por el organismo oficial competente. Los métodos comúnmente utilizados involucran la aplicación de vapor, fumigación o radiación.

Al utilizar vapor, algunos de los factores que deben ser controlados incluyen el tiempo de exposición y la temperatura. El proceso debe asegurar que todo el producto alcanza la temperatura deseada durante todo el periodo requerido, considerando la posibilidad de ser necesaria una fase de secado para eliminar la humedad añadida.

En el caso de la irradiación, algunos de los factores que deben controlarse incluyen la dosis, así como el tamaño y forma del envase, además de la penetrabilidad del material del envase con respecto al tipo de irradiación usado. El proceso debe asegurar que todo el producto esté expuesto a la dosis mínima de irradiación requerida para lograr el efecto deseado.

Aquellos factores que deben ser controlados al usar métodos de fumigación con el óxido de etileno o el óxido de propileno incluyen: la concentración de la sustancia, el tiempo de exposición, el vacío y/o la presión, la densidad del producto, así como la permeabilidad del gas en el material del envase. El proceso debe asegurar que todo el producto esté expuesto al gas durante todo el periodo requerido (Codex Alimentarius, 1995).

2.8.1 Tratamiento con irradiación

La irradiación de alimentos es un método de conservación que utiliza radiación ionizante, con la finalidad de combatir los agentes patógenos transmitidos por los alimentos, reducir la carga microbiana y la infestación por insectos, inhibir la germinación en los cultivos de raíces y prolongar la duración de los productos perecederos. Actualmente, muchos países utilizan irradiadores industriales para el tratamiento de productos alimenticios con fines comerciales.

En la irradiación de alimentos pueden utilizarse fuentes de radiación ionizante, tales como rayos gamma de los radionucleidos ^{60}Co o ^{137}Cs ; rayos X generados por máquinas que trabajan a energías de 5 MeV o inferiores; electrones generados por máquinas que trabajan a energías de 10 MeV o inferiores (Codex Alimentarius, 1979). Las especias, los condimentos vegetales secos, las hierbas, entre otros productos alimenticios suelen estar muy contaminadas por agentes en descomposición y gérmenes patógenos, y es posible descontaminarlos con dosis de radiación de 3-10

kGy sin alterar el sabor, la textura u otras propiedades. De esta forma la irradiación permite evitar la contaminación microbiana de los ingredientes secos, garantizando la inocuidad y mejorando la capacidad de almacenamiento de los alimentos que los contienen (OIEA, 1985).

En el artículo 175 del Reglamento Sanitario de los Alimentos, se establece la finalidad del proceso de irradiación y la dosis media que podrán recibir los alimentos. Respecto a ello las hortalizas secas, especias, condimentos, hierbas secas y tés de hierbas (Clase 6 de alimento) tiene como finalidad reducir el número de ciertos microorganismos patógenos y combatir la infestación por insectos, siendo la dosis máxima en el primer objetivo de 10,0 kGy y en el segundo de 1,0 kGy.

2.8.2 Tratamiento con Óxido de etileno

El óxido de etileno (OE) es un gas incoloro de estructura cíclica, caracterizado como el miembro más simple de la serie de los epóxidos, tiene una reactividad elevada a causa de su acción alquilante, a lo cual debe su aplicación como agente esterilizante capaz de inactivar microorganismos (Hidalgo *et al.*, 2002). En los últimos años se ha generalizado su empleo en esterilizar materiales termolábiles. Es así que se emplea para esterilizar catéteres, jeringuillas desechables, sondas, prótesis valvulares, instrumental endoscópico, en la industria farmacéutica, y otros (Jacas *et al.*, 2011). Actualmente también se ha utilizado en la industria de alimentos, en donde muchas hierbas aromáticas y especies se esterilizan con este tratamiento (Torres *et al.*, 2007).

Al óxido de etileno se le atribuyen algunos efectos nocivos para la salud. Los más importantes son la toxicidad, efectos cancerígenos y mutagénicos (Jacas *et al.*, 2011). La prevención actual de los riesgos tóxicológicos del óxido de etileno se basa principalmente en el control de las concentraciones del gas (Prat y Sanz, 1987).

En relación a lo expuesto anteriormente, se realizó esta investigación a fin de verificar el cumplimiento de los criterios microbiológicos establecidos por la legislación actual en hierbas para infusión (menta, manzanilla, boldo y cedrón), dependiendo del lugar, la forma de adquisición y del tratamiento desinfectante al que éstas han sido expuestas.

3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

Las infusiones de hierbas cumplen con los criterios microbiológicos establecidos en la reglamentación vigente, dependiendo del lugar donde se adquieran y de la efectividad del tratamiento al que hayan sido sometidas, implicando su carácter de inocuo para el consumo humano.

3.2 Objetivo General

- Realizar un control microbiológico de las infusiones de hierbas más ofertadas y reconocidas del mercado (Menta, Manzanilla, Boldo y Cedrón), en su formato de origen (hierba seca) y en su formato de consumo habitual como infusión con agua hirviendo, para comprobar el cumplimiento de los criterios microbiológicos establecidos por la reglamentación vigente.

3.3 Objetivos Específicos

- Realizar recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (RAM) y enterobacterias, presentes en las muestras.
- Comparar y analizar los resultados obtenidos para cada tipo de hierba, respecto al cumplimiento con la legislación vigente, tratamiento aplicado para reducir contenido microbiano y origen (mercado establecido e informal/ expendio a granel y en envases individuales).

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales

4.1.1 Insumos

- Infusión Herbal Menta, Manzanilla y Cedrón, Marca A*
- Infusión Herbal Menta, Manzanilla, Boldo y Cedrón, Marca B*
- Infusión Herbal Menta, Manzanilla, Boldo y Cedrón, Marca C*
- Infusión Herbal Menta, Manzanilla, Boldo y Cedrón, Marca D**

4.1.2 Equipos y Softwares

- Estufa de incubación $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. *LabTech*
- Autoclave. KSG Olching D-8037
- Baño termostático $47^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Arquimed YCW-03S
- Microondas Somela
- Contador de colonias. Stuart™
- Agitador Vortex. VISION KMC-1300V
- Balanza analítica. Radwag AS 220/C2
- Software Statgraphics Centurión XV.II para análisis estadísticos.

4.1.3 Medios de Cultivos y Reactivos

- Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa (VRBG)
- Agar Tripticasa Soya (TSA)
- Agua peptonada al 0,1%

4.1.4 Material de Laboratorio

- Pipetas estériles
- Propipetas
- Placas Petri
- Mechero
- Gradillas
- Vasos precipitados
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio

* Adquiridas en mercado establecido.

** Adquiridas en mercado informal.

4.2 Metodología

Esta investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

4.2.1 Diseño de la Investigación

4.2.2 Población de estudio y muestras

Se realizó el análisis de 4 tipos de hierbas para infusión, menta, manzanilla, boldo y cedrón, adquiridas en diferentes supermercados y locales de expendio a granel de la Región Metropolitana. Las hierbas Marca A corresponden a muestras sin irradiar, tratadas solo con óxido de etileno, las hierbas Marca B corresponde a muestras irradiadas, las hierbas Marca C corresponden a hierbas a granel adquiridas en mercados establecidos y las hierbas Marca D corresponden a hierbas conseguidas en el comercio ambulante. La unidad de muestra correspondió a 10 bolsitas de 1 g cada una para las marcas A y B en sus diferentes variedades de hierbas, y para el expendio a granel la muestra fue de 1 g. En el caso de la infusión propiamente tal, se analizó una alícuota de ésta obtenida de 1 g de hierba en 200 ml de agua hervida, mantenida por un tiempo de 5 min. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Los análisis realizados a las muestras incluyeron el recuento de microorganismos aerobios mesófilos (RAM) y de enterobacterias.

4.2.2.1 Información de muestras analizadas

❖ Infusión Herbal Menta, Manzanilla y Cedrón, Marca A

Estas hierbas fueron adquiridas del comercio formal (supermercado) comercializadas en cajas de 20 unidades, formato de saquitos individuales de aproximadamente 1 g. El peso neto contenido en cada caja fue entre 20-24 g (dependiendo de la hierba), siendo el peso por saquito entre 1-1,2 g. La preparación sugerida es: colocar una

bolsita de infusión en una taza, agregar 200 ml de agua recién hervida a 100°C, dejar reposar de 2 a 3 min.

Estas hierbas son fabricadas y envasadas en Chile, y posee Resolución Sanitaria.

Estos productos no especifican en su envase con qué tratamiento han sido procesados. Sin embargo, por fuentes responsables se pudo tener conocimiento que se utiliza óxido de etileno para reducir la carga microbiana que contienen las hierbas.

Este producto es comercializado en Argentina, España, Brasil, México, Uruguay, Paraguay, Chile, Perú, El Salvador, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Colombia, Venezuela, Ecuador, Bolivia, Honduras, República Dominicana y toda la región Centroamericana, además de Estados Unidos y Canadá.

La especificación botánica de cada hierba analizada para esta Marca son: hierba cedrón (*Lippia Citriodora*); hierba manzanilla (*Matricaria Chamomilla*); hierba menta (*Mentha Viridis*). Se debe mencionar que la hierba boldo antes era comercializada por esta marca en Chile, pero por un motivo que se desconoce, fue retirada del mercado. Debido a esta razón no pudo ser utilizada en este estudio.

La Empresa de las hierbas Marca A, fue creada en 1930, la cual posee un tamaño grande. Esta recibe la materia prima (hierbas deshidratadas) del extranjero de países como India, Indonesia, Kenia o Sri Lanka.

❖ **Infusión Herbal Menta, Manzanilla, Boldo y Cedrón, Marca B**

Estas hierbas fueron adquiridas del comercio formal (supermercado) comercializadas en cajas de 20 unidades, formato de saquitos individuales de aproximadamente 1 g.

El peso neto contenido en cada caja fue entre 20-26 g (dependiendo de la hierba), siendo el peso por saquito entre 1-1,3 g. Se debe conservar en lugar fresco y seco.

La preparación sugerida es de 95°C por 3-5 min.

Es un producto chileno y posee Resolución Sanitaria.

Este producto especifica en su envase que ha sido procesado con energía ionizante.

Es exportado a: USA, Paraguay, Guatemala, Uruguay, Venezuela, Ecuador, Honduras, Australia, Bolivia, Panamá, Perú, Salvador y Nicaragua.

La especificación botánica de cada hierba analizada para esta Marca son: hierba cedrón (*Aloysia Triphylla*); hierba manzanilla (*Chamomilla Recutita*); hierba boldo (*Peumus Boldus*); hierba menta (*Mentha Piperita*).

La empresa chilena de hierbas Marca B data de 1875, siendo una Empresa de tamaño grande. Esta posee plantaciones de hierbas ubicadas en las laderas de la cordillera de Los Andes, en el centro y sur de Chile, además de un campo de 5 mil hectáreas en Quilpué (Capital, 2007).

❖ **Infusión Herbal Menta, Manzanilla, Boldo y Cedrón, Marca C**

Estas hierbas fueron adquiridas del comercio formal (supermercado) comercializadas a granel en bolsas de celofán con un contenido de hojas y/o flores (dependiendo de la hierba) con un peso neto de 8 g. La preparación sugerida es colocar 2-3 hojas o 1 cucharadita de flores para una taza, añadir agua hirviendo y dejar reposar 5 min.

Estas hierbas son de origen chileno y posee Resolución Sanitaria.

No utiliza ningún tratamiento de reducción microbiana en las hierbas.

Los productos incluyen una línea de hierbas aromáticas (variando la presentación y tipo de producto), línea de frutos secos (conjunto de frutas altas en antioxidantes deshidratadas), línea de productos naturales (baños, shampoo, jabón, inhalaciones). Estos productos son comercializados en Chile desde la quinta a la décima región en algunos supermercados, en hoteles, termas y tiendas gourmet.

La especificación botánica de cada hierba analizada para esta Marca son: hierba cedrón (*Lippia Citriodora*); hierba manzanilla (*Matricaria Chamomilla*); hierba boldo (*Peumus Boldo*); hierba menta (*Mentha Piperita*).

La Empresa de hierbas Marca C, inició sus actividades en 1999, en el sector rural de Hueleco en la comuna de San Pablo, es una empresa de tamaño pequeño. En el Fundo Hueleco cultivan de manera orgánica, una gran variedad de hierbas aromáticas las cuales son cosechadas a mano, secadas en forma natural, en la sombra y a temperatura ambiental, sin otro tratamiento, aditivos o energía ionizante.

❖ **Infusión Herbal Menta, Manzanilla, Boldo y Cedrón, Marca D**

Estas hierbas fueron adquiridas del comercio informal (comercio ambulante, calle, quiosco) comercializadas a granel en bolsas de plástico con un contenido de hojas, flores, ramas, palos, etc. (dependiendo de la hierba) con un peso no especificado en el envase. La preparación sugerida no es señalada.

En el envase no se especifica ningún tratamiento de reducción microbiana en las hierbas ni el origen del producto.

Estas hierbas cumplen con Resolución del S.N.S. No se especifica la especie de la cual proviene cada hierba.

La Empresa de hierbas Marca D, vende productos naturales nacionales e importados (peruanos) (Evisos, 2018). Se desconoce el tamaño de esta empresa y cualquier otra información relevante.

4.3 Métodos

Las metodologías empleadas para realizar el análisis microbiológico fueron de acuerdo a NCh2659.Of2002 para RAM (INNa, 2002) y NCh2676.Of2002 para el recuento de enterobacterias (INNb, 2002).

4.3.1 Hierba deshidratada

Se analizó el contenido de 10 bolsitas de cada hierba (aprox. 10 g) y se diluyó con agua peptonada al 0,1 % en una proporción 1:9. Para la muestra a granel se pesaron 10 g del producto. Se efectuaron las diluciones decimales correspondientes y se sembraron alícuotas de 1 ml en placas de Petri estériles. Para el RAM se adicionó 15-20 ml de agar TSA y para el recuento de enterobacterias 15-20 ml de agar VRBG. Se agitó previamente y luego de solidificar se incubaron las placas en estufa de cultivo a 35°C por 24 – 48 h. Se efectuó el recuento y cálculo de las ufc/g de muestra. Los recuentos se efectuaron en triplicado.

El límite de detección/cuantificación de este método, de acuerdo a la forma de obtener la primera dilución a sembrar, es de 10 ufc/g.

4.3.2 Infusión de hierba

Se efectuó la infusión de 1 bolsita (aprox. 1g) o 1 g del producto a granel en 200 ml de agua hervida por 5 min. Se tomaron alícuotas y se efectuaron diluciones decimales. Se sembraron alícuotas en placas Petri estériles. Para el RAM se adicionó 15-20 ml de agar TSA y para el recuento de enterobacterias 15-20 ml de agar VRBG. Se agitó y luego de solidificar se incubaron las placas en estufa de cultivo a 35°C por 24 – 48 h. Posteriormente, se realizó el recuento y se informó en ufc/g de muestra. Los ensayos se efectuaron en triplicado.

El límite de detección/cuantificación de este método, de acuerdo a la forma de obtener la primera dilución a sembrar, es de 200 ufc/g.

4.3.3 Análisis estadístico

Los resultados de aerobios mesófilos y enterobacterias se analizaron estadísticamente a través de un análisis de varianza (ANOVA) Multifactorial y la prueba de rangos múltiples (LSD) de Fisher, considerando como factores las muestras (tipo de hierba de distintas marcas) y la condición de análisis (hierba deshidratada e infusión), con el propósito de determinar la existencia de diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (**Anexo 4**).

El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurión XV.II.

5. Resultados y Discusión

5.1. Determinación del contenido de microorganismos aerobios mesófilos (RAM) y enterobacterias presentes en muestras de hierbas, en estado deshidratado e infusión.

5.1.1. Marca A

5.1.1.1. Resultados contenido microbiano en hierba menta, manzanilla y cedrón, marca A.

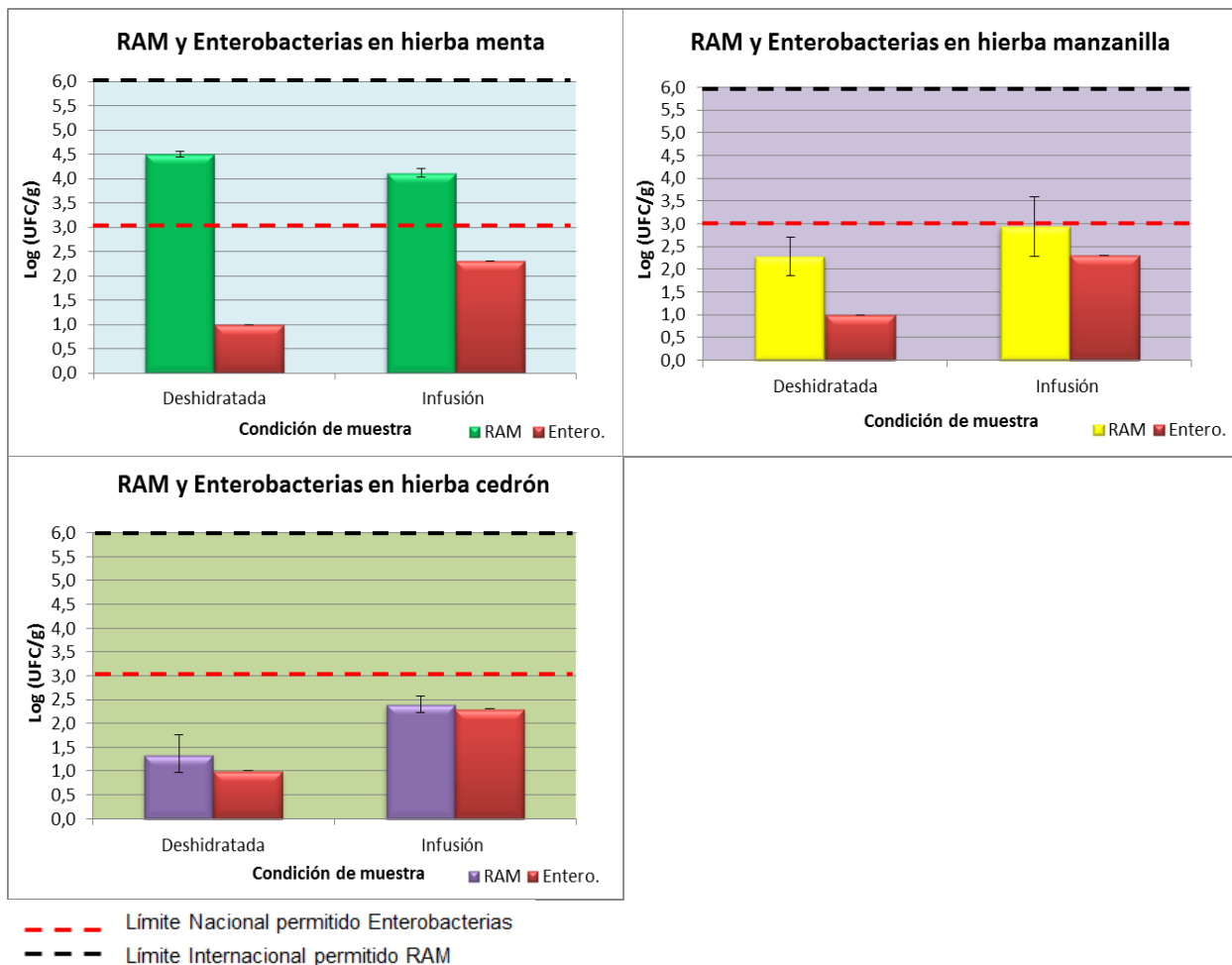


Figura 2. Resultados de calidad microbiológica de hierbas Marca A

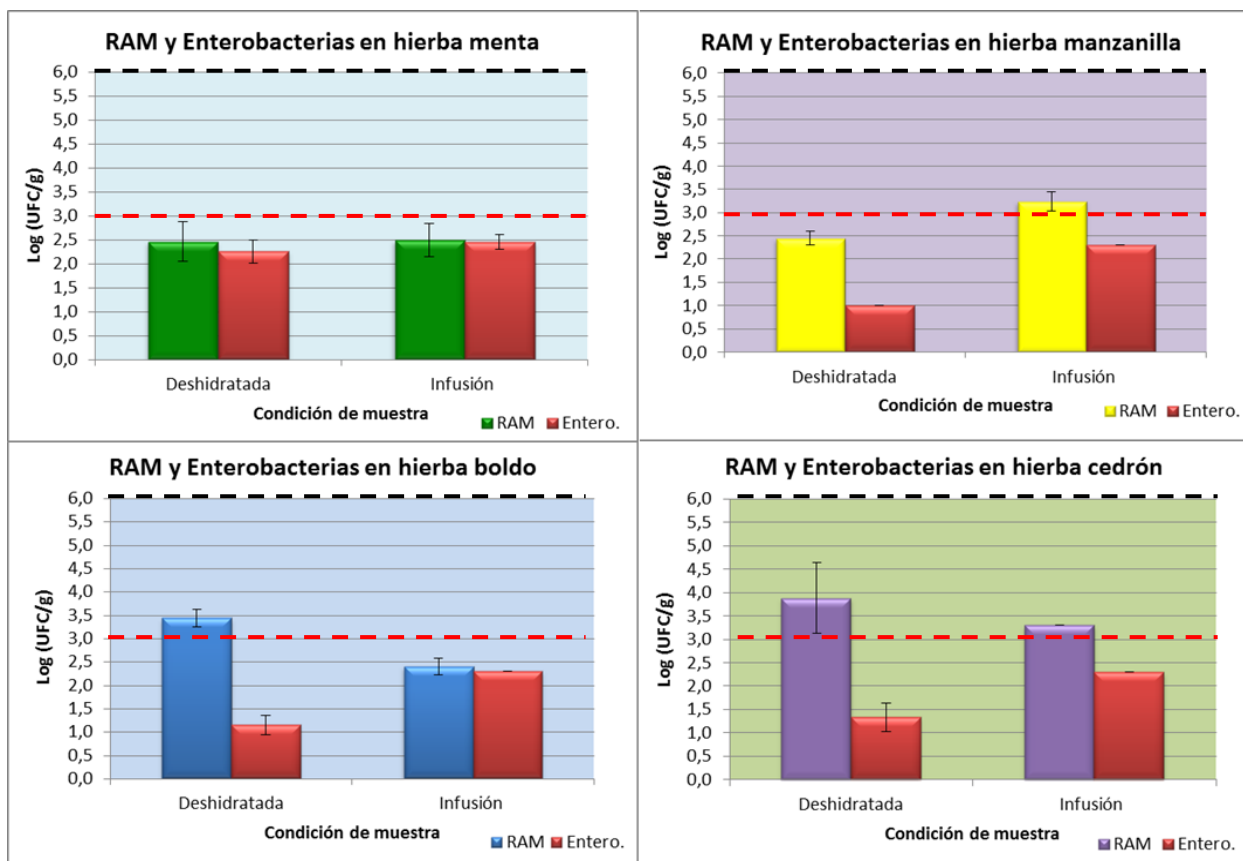
En la **Figura 2** se presentan los resultados de RAM y enterobacterias obtenidos para hierba menta, manzanilla y cedrón Marca A, en condición de muestra deshidratada e infusión. Se logra apreciar que la hierba menta presentó el mayor contenido de bacterias aerobias mesófilas, tanto en condición de muestra deshidratada ($3,2 \times 10^4$ UFC/g) como en infusión ($1,4 \times 10^4$ UFC/g), siguiendo hierba manzanilla ($2,8 \times 10^2$

UFC/g condición deshidratada y $1,7 \times 10^3$ UFC/g condición en infusión) y por último hierba cedrón ($3,0 \times 10^1$ UFC/g condición deshidratada y $2,7 \times 10^2$ UFC/g condición en infusión).

Respecto al contenido de enterobacterias, es posible observar que todas las muestras analizadas en condición de muestra deshidratada ($< 1,0 \times 10^1$ UFC/g) e infusión ($< 2,0 \times 10^2$ UFC/g) presentaron un escaso desarrollo microbiano. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede determinar que aquella hierba que posee **mayor calidad** por su bajo contenido microbiano general (no por una condición particular) es **hierba cedrón Marca A**, y aquella que expresa una **menor calidad** es **hierba menta Marca A**. No obstante, todas estas hierbas cumplen con lo exigido por la legislación, lo cual se discutirá posteriormente.

5.1.2. Marca B

5.1.2.1. Resultados contenido microbiano en hierba menta, manzanilla, boldo y cedrón marca B.



--- Límite Nacional permitido Enterobacterias
 --- Límite Internacional permitido RAM

Figura 3. Resultados de calidad microbiológica de hierbas Marca B.

En la **Figura 3** se exponen los resultados de RAM y enterobacterias obtenidos para hierba menta, manzanilla, boldo y cedrón Marca B, en condición de muestra deshidratada e infusión. Se observa que la hierba que presentó un mayor contenido de bacterias aerobias mesófilas fue cedrón en condición de muestra deshidratada ($1,4 \times 10^4$ UFC/g) e infusión ($2,0 \times 10^3$ UFC/g) y aquella que obtuvo el menor valor fue boldo en condición de muestra en infusión ($2,7 \times 10^2$ UFC/g). Respecto al contenido de enterobacterias, la muestra que presentó un mayor contenido fue menta en condición de muestra deshidratada y la que evidenció el menor recuento fue manzanilla en condición de muestra deshidratada ($<1,0 \times 10^1$ UFC/g) e infusión ($<2,0 \times 10^2$ UFC/g). Debido a los resultados obtenidos es posible apreciar que todas las hierbas cumplen con los límites exigidos por la legislación, pero la hierba que expresa una **mayor calidad** (debido a un mayor cumplimiento de la Legislación Nacional en el contenido de enterobacterias) es la **hierba manzanilla**. Al contrario, la hierba que se considera con **menor calidad** (debido a su elevado contenido microbiano), es la **hierba cedrón**.

5.1.3. Marca C

5.1.3.1. Resultados contenido microbiano en hierba menta, manzanilla, boldo y cedrón Marca C.

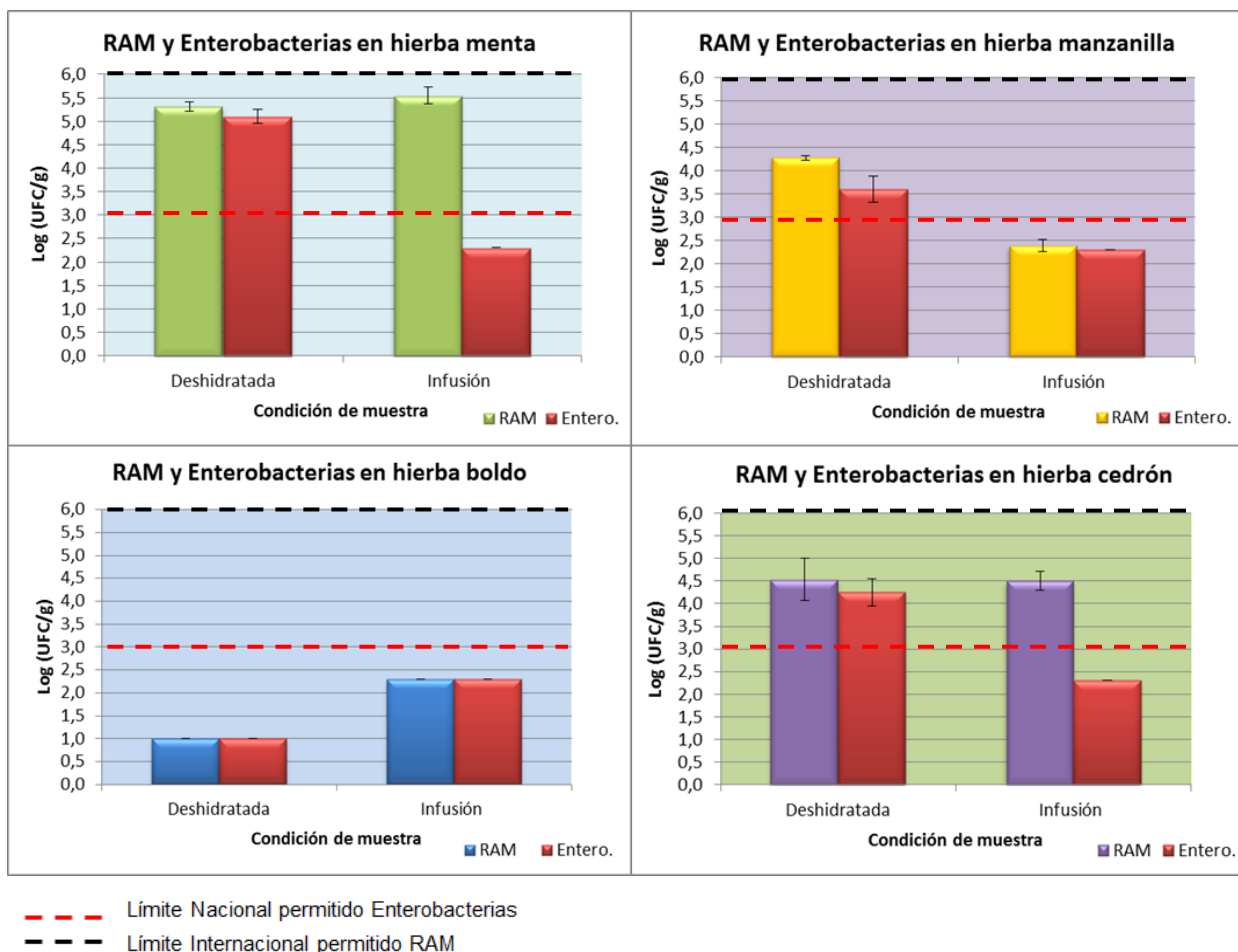


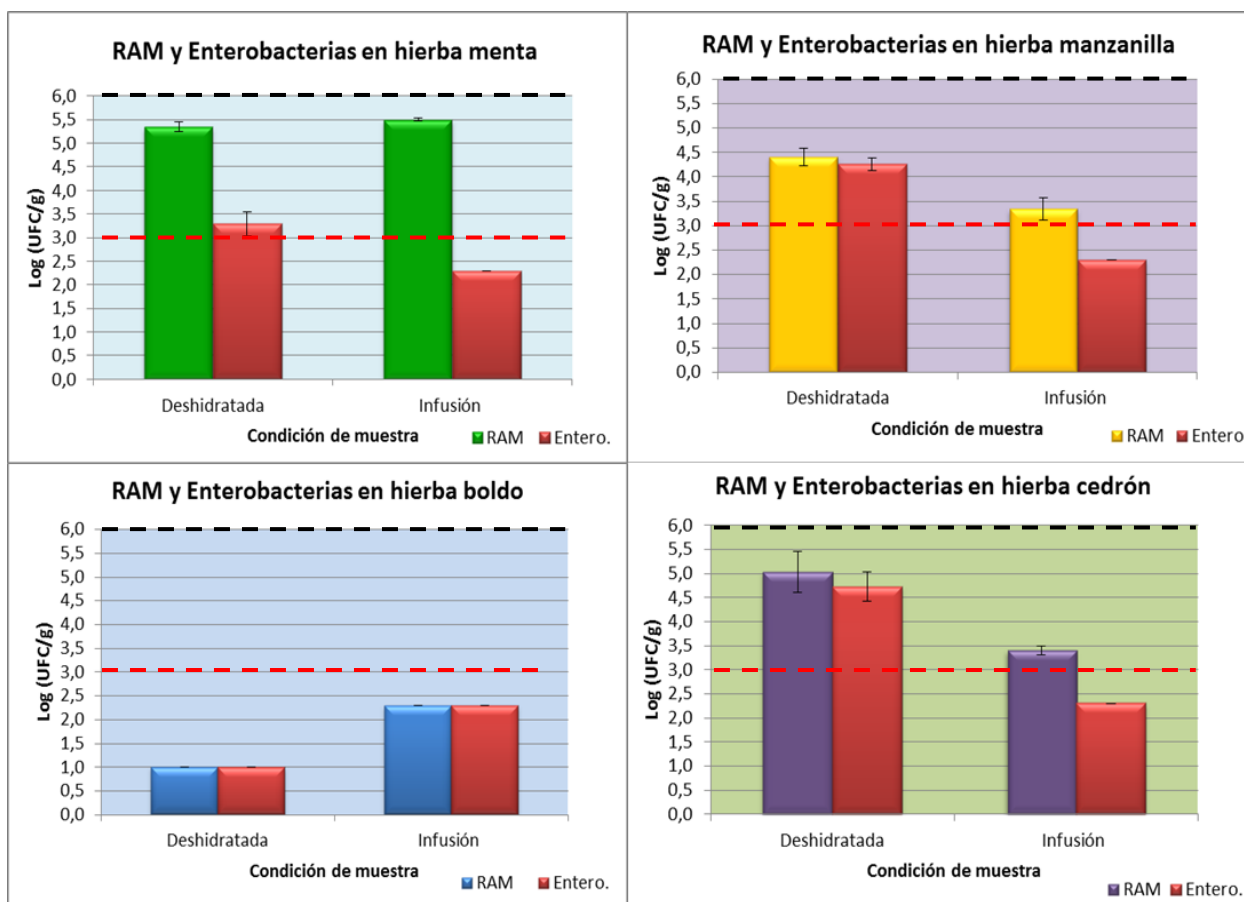
Figura 4. Resultados de calidad microbiológica de hierbas Marca C.

En la **Figura 4** se presentan los resultados de RAM y enterobacterias obtenidos para hierba menta, manzanilla, boldo y cedrón Marca C, en condición de muestra deshidratada e infusión. Se aprecia que la hierba que presentó un mayor contenido de bacterias aerobias mesófilas fue menta en condición de muestra en infusión ($3,8 \times 10^5$ UFC/g), y aquella que obtuvo el menor valor fue boldo en condición de muestra deshidratada ($< 1,0 \times 10^1$ UFC/g) e infusión ($< 2,0 \times 10^2$ UFC/g). Respecto al contenido de enterobacterias, la muestra que presentó un mayor contenido fue menta en condición de muestra deshidratada ($1,2 \times 10^5$ UFC/g) y la que evidenció el menor recuento fue nuevamente boldo en condición de muestra deshidratada

(<1,0x10¹ UFC/g) e infusión (<2,0x10² UFC/g). No obstante, se debe señalar que hierba menta, manzanilla y cedrón también presentaron el menor recuento en condición de muestra en infusión. De acuerdo a los resultados obtenidos se logra determinar que la hierba que presenta una **mayor calidad** es la **hierba boldo** debido a su escaso desarrollo microbiano (RAM y enterobacterias), en condición de muestra deshidratada e infusión. Al contrario, la hierba que se considera con **menor calidad** (por su elevado contenido microbiano) es la **hierba menta**, ya que sobrepasa el límite máximo permitido por la legislación Nacional en el contenido de enterobacterias (en condición de muestra deshidratada), siendo superior este valor respecto a las otras hierbas que tampoco cumplen con la reglamentación.

5.1.4. Marca D

5.1.4.1. Resultados contenido microbiano en hierba menta, manzanilla, boldo y cedrón Marca D.



--- Limite Nacional permitido Enterobacterias
 --- Limite Internacional permitido RAM

Figura 5. Resultados de calidad microbiológica de hierbas Marca D.

En la **Figura 5** se exponen los resultados de RAM y enterobacterias obtenidos para hierba menta, manzanilla, boldo y cedrón Marca D, en condición de muestra deshidratada e infusión. Observando la Figura anterior, la hierba que presentó un mayor contenido de bacterias aerobias mesófilas fue menta en condición de muestra en infusión ($3,1 \times 10^5$ UFC/g), siguiéndole ésta misma en condición de muestra deshidratada ($2,3 \times 10^5$ UFC/g), y aquella que presentó el menor contenido fue boldo en condición de muestra deshidratada ($<1,0 \times 10^1$ UFC/g) e infusión ($<2,0 \times 10^2$ UFC/g). En relación al contenido de enterobacterias, la muestra cedrón en condición deshidratada ($6,9 \times 10^4$ UFC/g) reflejó el mayor valor, y el menor valor lo manifestó la hierba menta, manzanilla y cedrón en infusión, y la hierba boldo en condición deshidratada e infusión. Debido a los resultados obtenidos se logra determinar que la hierba con **mayor calidad** (manifestado por su bajo contenido microbiano) es la **hierba boldo** en estado deshidratado e infusión ya que ésta no presentó desarrollo microbiano (aerobios mesófilos y enterobacterias) en ninguna condición de muestra. Sin embargo, la hierba que se considera con **menor calidad** (por su elevado contenido microbiano y el menor cumplimiento de la legislación) es la **hierba menta** en condición deshidratada (contenido RAM y enterobacterias) e infusión (contenido RAM).

5.2. Verificación y determinación del cumplimiento de la Legislación vigente, en el contenido microbiológico en hierbas para infusión.

Considerando las exigencias microbiológicas en la Legislación nacional e internacional en hierbas para infusión, se puede constatar que todas las muestras de hierbas Marca A y Marca B en estado deshidratado e infusión, cumplieron con los estándares para Aerobios mesófilos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el real decreto de la UE, y la Legislación Argentina, ya que ninguna de las muestras analizadas presentó aerobios mesófilos por sobre el límite permitido por la reglamentación, siendo de 10^7 UFC/g (OMS y Legislación Argentina) y 10^6 UFC/g (Real decreto UE).

En relación al contenido de enterobacterias, también se demuestra el cumplimiento de éstas Marcas con lo estipulado por el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) y la Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, ya que se obtuvieron valores inferiores a 10^3 UFC/g.

Por otra parte, las hierbas Marca C y Marca D, evidenciaron mayor contaminación. En el caso del contenido de aerobios mesófilos, todas cumplieron con la Reglamentación, aunque presentaron valores superiores de microorganismos en comparación a las hierbas Marca A y B.

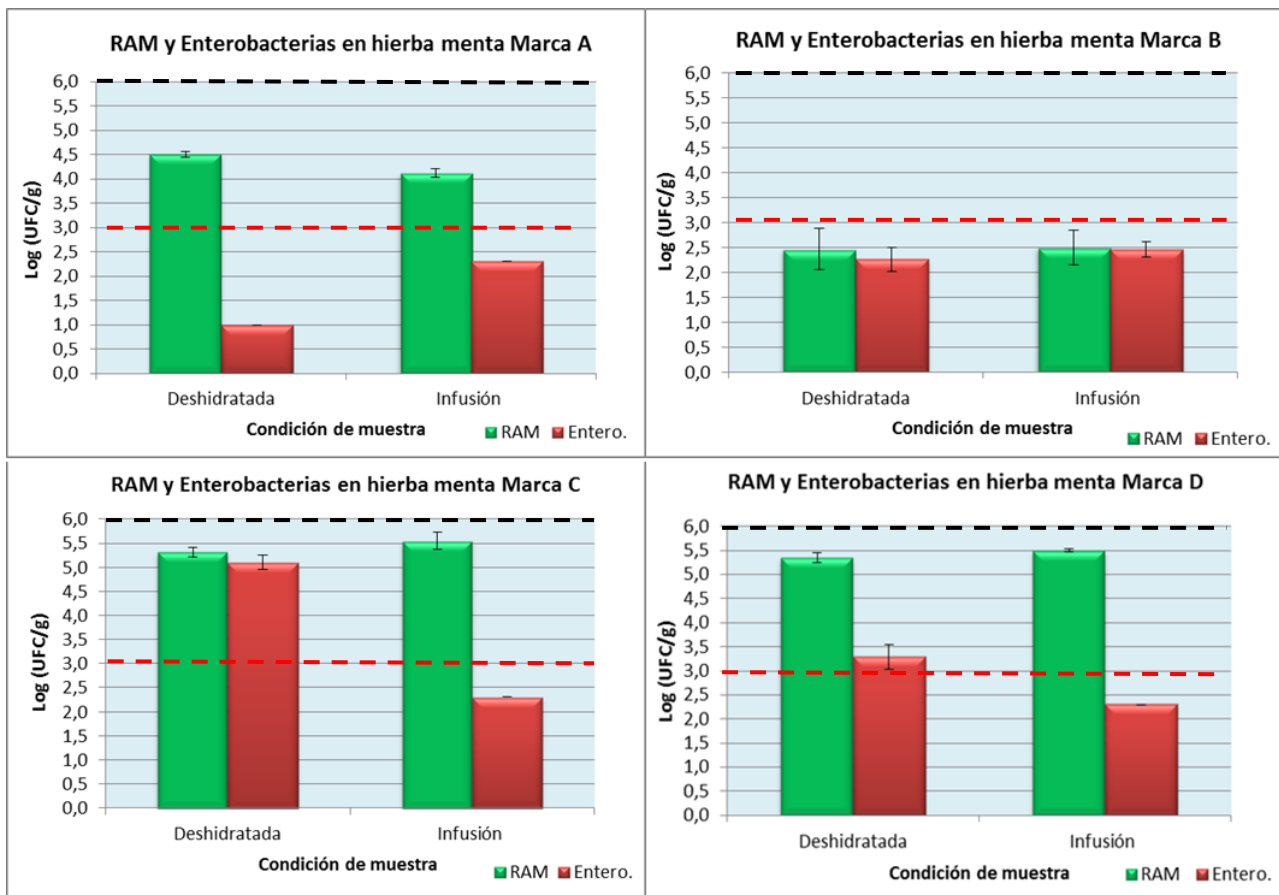
Respecto al contenido de enterobacterias, varias hierbas no cumplieron con lo exigido por la Legislación, tal fue el caso de la hierba menta ($1,2 \times 10^5$ UFC/g), manzanilla ($4,4 \times 10^3$ UFC/g), cedrón ($2,1 \times 10^4$ UFC/g), en condición deshidratada, Marca C, y asimismo, para la hierba menta ($2,2 \times 10^3$ UFC/g), manzanilla ($1,8 \times 10^4$ UFC/g) y cedrón ($6,9 \times 10^4$ UFC/g) en condición deshidratada, Marca D, ya que los valores obtenidos fueron superiores a lo exigido por el RSA y la Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (10^3 UFC/g).

En la literatura se encontró un reporte de un análisis microbiológico de hierbas medicinales, en dónde todos los recuentos de bacterias aerobias mesófilas efectuados estuvieron comprendidos dentro de los valores estipulados por la legislación vigente, ya que se encontraron entre $2,0 \times 10^3$ y $5,3 \times 10^6$ UFC/g de muestra, los cuales no fueron coincidentes con otros resultados en los cuales se reportaron recuentos más elevados y la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (Sánchez *et al.*, 2006).

En otra investigación realizada en muestras de infusión de menta y anís estrella, los resultados obtenidos mostraron una baja calidad microbiológica en las infusiones de hierbas, evidenciando que el 85,7% de las muestras de infusión de menta presentan recuentos de bacterias aerobias totales que sobrepasan la norma internacional de la OMS, manifestando recuentos superiores a 10^5 UFC/g (Arias *et al.*, 1999).

5.3. Comparación del contenido microbiano en tipos de hierbas de distintas marcas.

5.3.1. Menta variedad de marcas.



--- Límite Nacional permitido Enterobacterias
--- Límite Internacional permitido RAM

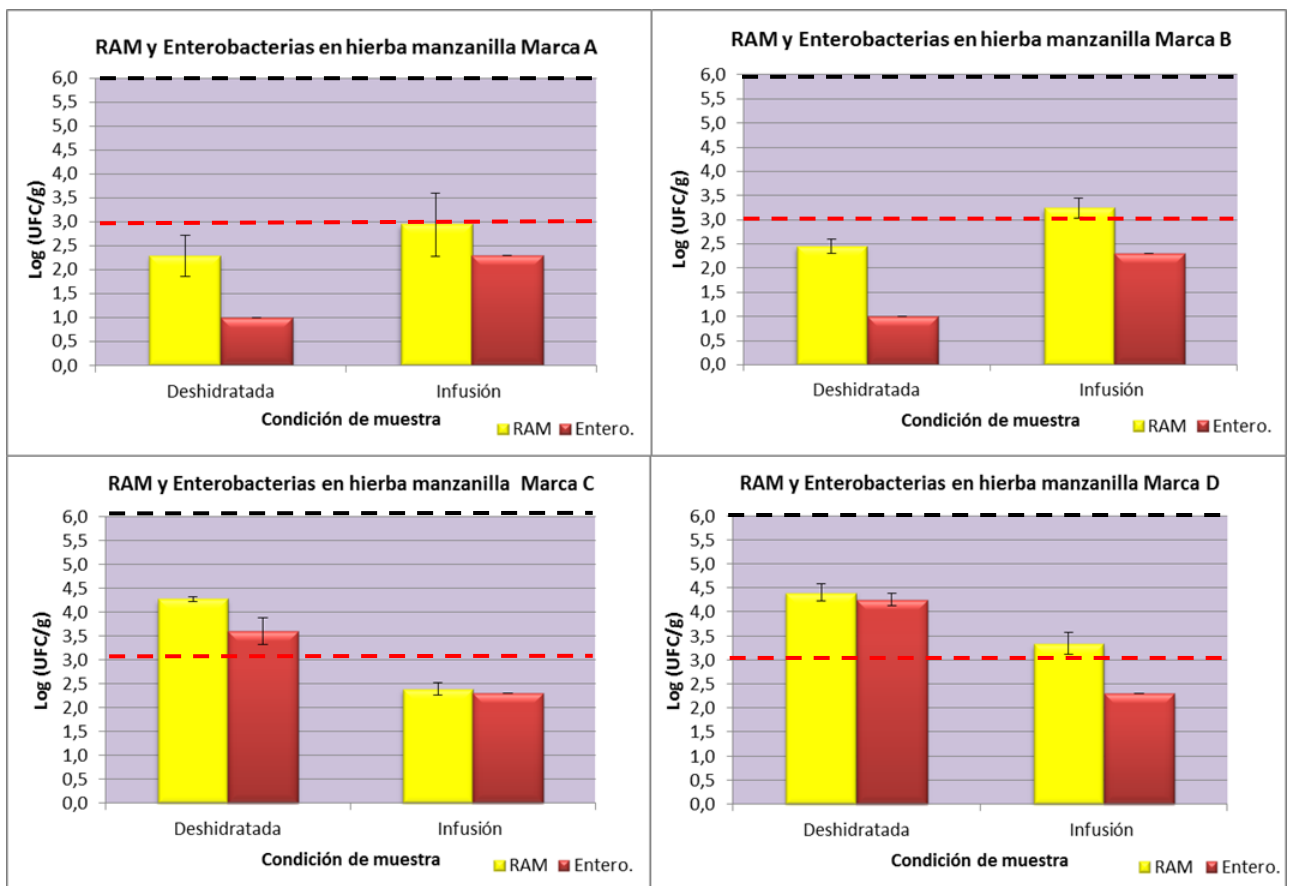
Figura 6. Hierba menta deshidratada y en infusión, variedad de marcas.

En la **Figura 6**, se presenta gráficamente los resultados del recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias, para hierba menta Marca A, Marca B, Marca C y Marca D. Respecto al recuento de bacterias aerobias mesófilas y enterobacterias considerando la condición deshidratada e infusión, la Marca que posee **mayor calidad**, evidenciado por su bajo contenido microbiano es la hierba menta **Marca B**. Sin embargo, aunque ésta no posee el menor recuento de enterobacterias, al comparar en términos generales con las otras muestras, expresa el menor contenido microbiano. Al contrario, la Marca con **menor calidad** es hierba menta **Marca C**,

respecto al elevado contenido de aerobios mesófilos y el incumplimiento de la reglamentación con el contenido de enterobacterias.

Al comparar estadísticamente los valores de aerobios mesófilos obtenidos para muestra menta de distinta Marca, se evidenció la existencia de diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%, lo cual se comprueba con el *Valor-P* obtenido, el cual fue inferior a 0,05. Al observar la prueba de múltiples rangos para RAM por factor muestra, se manifiesta que la Marca A y B difieren significativamente en los recuentos de aerobios mesófilos respecto a las Marcas C y D, lo cual es esperable debido a la procedencia y forma de venta de cada hierba, ya que es de suponer que aquellas envasadas en bolsitas individuales pasan por un proceso industrial más inocuo y limpio que aquellas vendidas a granel. Sin embargo, para el factor condición aplicado a RAM y enterobacterias en hierba menta, no se evidenció la existencia de diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%, lo que se observa en el *Valor-P* obtenido el cual fue superior a 0,05.

5.3.2. Manzanilla variedad de marcas.



- - - Limite Nacional permitido Enterobacterias
- - - Limite Internacional permitido RAM

Figura 7. Hierba manzanilla deshidratada y en infusión, variedad de marcas.

En la **Figura 7**, se presenta gráficamente los resultados del recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias, para hierba manzanilla Marca A, Marca B, Marca C y Marca D. Al comparar de forma general los gráficos expuestos anteriormente, se puede determinar que la **Marca A**, es la que posee una **mayor calidad**, ya que en condición de muestra deshidratada e infusión presentó un bajo contenido microbiano, en relación a las otras muestras. Por el contrario, aquella Marca que por su elevado contenido microbiano presenta la **menor calidad** en condición deshidratada e infusión, es la **Marca D**. No obstante, se debe señalar que la mayor y menor calidad ha sido determinada no por el mayor o menor contenido microbiano, sino de acuerdo al análisis global de cada Marca, considerando también los límites microbiológicos exigidos por la legislación.

Para hierba manzanilla de distinta marca no se evidenció la existencia de diferencias significativas en el contenido de aerobios mesófilos y enterobacterias, en condición deshidratada e infusión, con un nivel de confianza del 95%, ya que el *Valor-P* fue mayor a 0,05 en ambos caso.

5.3.3. Boldo variedad de marcas.

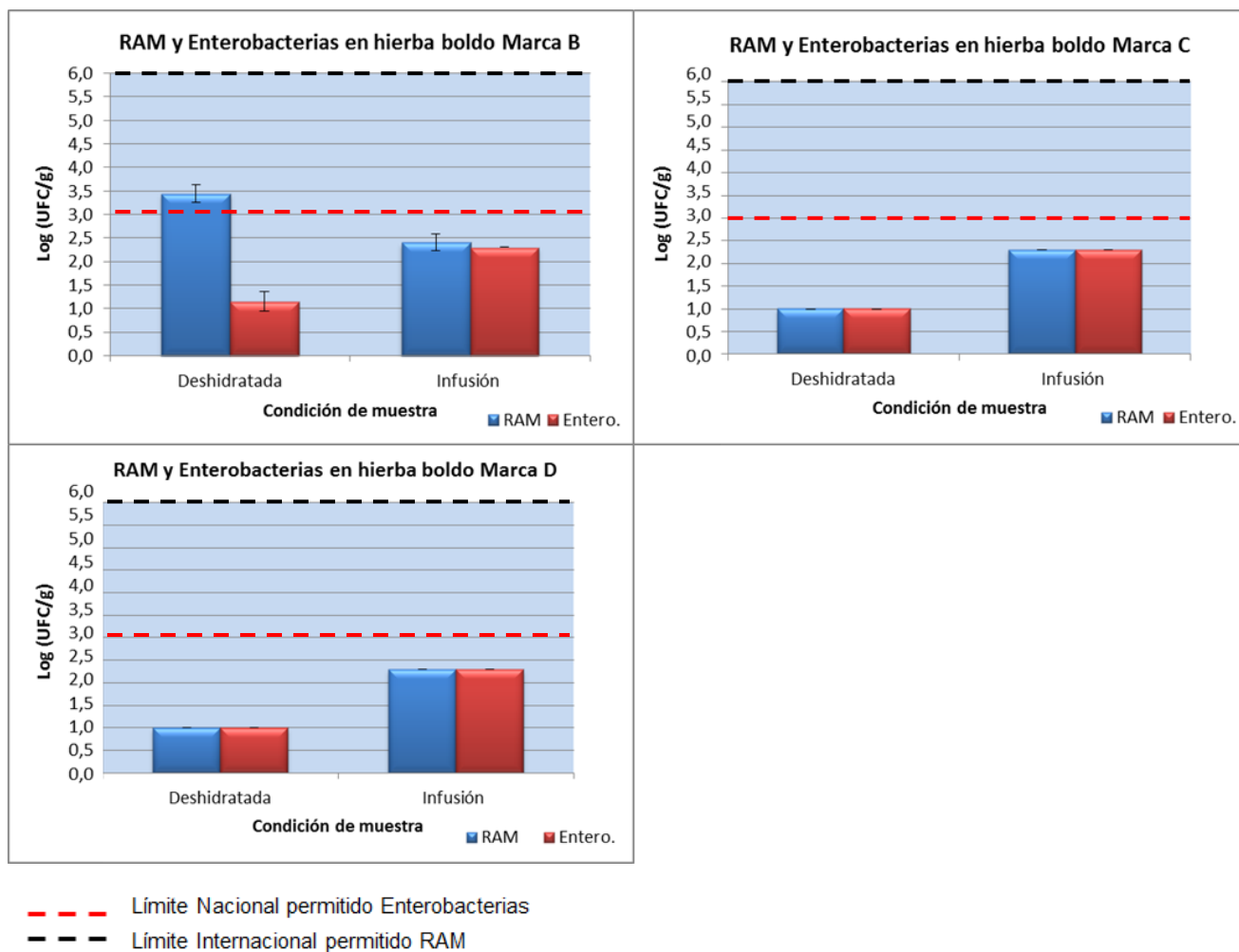


Figura 8. Hierba boldo deshidratada y en infusión, variedad de marcas.

En la **Figura 8**, se presenta gráficamente los resultados del recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias, para hierba boldo Marca B, Marca C y Marca D. Respecto al recuento de bacterias aerobias mesófilas y enterobacterias, la Marca que posee **mayor calidad**, evidenciado por su bajo contenido microbiano es la **Marca C y D**. Por otra parte, la Marca que obtiene una **menor calidad** por su mayor contenido microbiano (RAM y enterobacterias), es la **Marca B**.

Respecto al análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas en el contenido microbiano en el factor muestra, entre hierbas boldo de distinta marca. No obstante, para el caso del contenido de enterobacterias en el factor condición, si

existió diferencia significativa, con un nivel de confianza del 95%, lográndose un *Valor-P* menor a 0,05. Esto se ve reflejado en los recuentos obtenidos de enterobacterias para boldo, los cuales aumentan en condición de infusión.

5.3.4. Cedrón variedad de marcas.

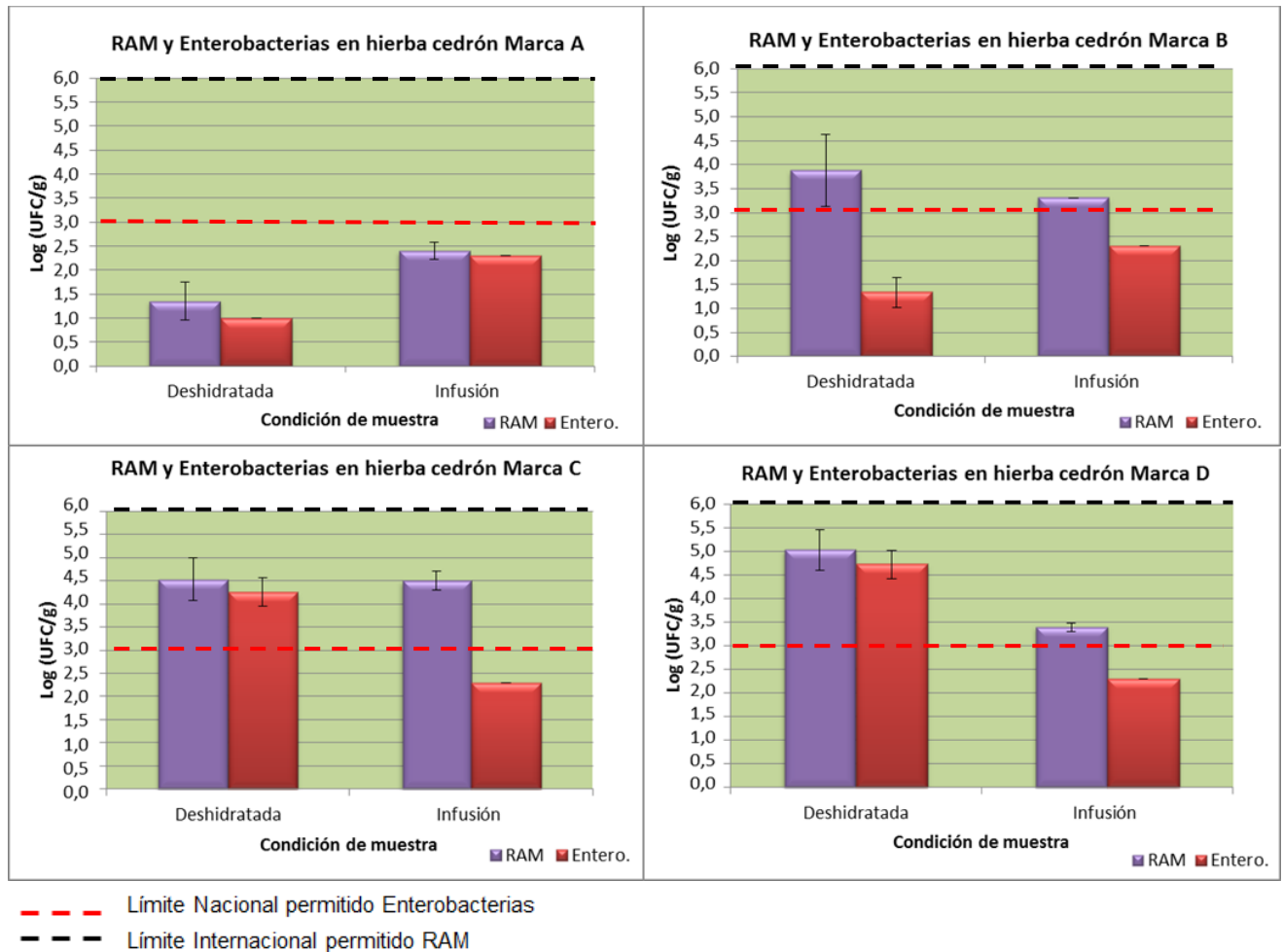


Figura 9. Hierba cedrón deshidratada y en infusión, variedad de marcas.

En la **Figura 9**, se presenta gráficamente los resultados del recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias, para hierba cedrón Marca A, Marca B, Marca C y Marca D. Respecto al recuento de bacterias aerobias mesófilas y enterobacterias, la Marca que presenta una **mayor calidad**, evidenciado por el menor contenido microbiano en condición de muestra deshidratada e infusión, además del cumplimiento de los límites microbiológicos de acuerdo a la legislación es la **Marca A** y la que presenta una **menor calidad** por su mayor contenido microbiano es la **Marca D**.

En relación al análisis estadístico realizado, no se encontró la existencia de diferencias significativas en el contenido de aerobios mesófilos y enterobacterias en hierba cedrón de distinta marca y en condición deshidratada e infusión, con un nivel de confianza del 95%, ya que el *Valor-P* fue superior a 0,05 en ambos casos.

5.4. Análisis en relación a las características inherentes al tipo de hierba.

Se investigó el contenido microbiano propio de cada hierba. Sin embargo, dado que la información es sumamente específica no se pudo encontrar evidencia consistente en todos los casos, pero se puede suponer que algunos tipos de hierbas sean propensos a desarrollar más microorganismos que otros en ciertas circunstancias (condición deshidratada e infusión), independiente de poseer características antimicrobianas. Además, se puede considerar que factores como la procedencia, la recolección, los tipos de tratamiento aplicados, el transporte, la manipulación y el almacenamiento (Torres *et al.*, 2007) pudieron favorecer en la presencia y/o el desarrollo microbiano en las hierbas estudiadas. Así como también lo reafirma Banach (2016), declarando que la cadena de suministro de especias y hierbas es vulnerable a contaminaciones químicas y microbiológicas deliberadas, accidentales o naturales, mientras que la causa es a menudo difícil de determinar.

En la literatura se reporta que la inadecuada manipulación de alimentos durante su comercialización o preparación, está relacionado a la deficiente conservación de los alimentos y hábitos de consumo, debido a la pobre cultura sanitaria en los manipuladores de alimentos, incluyendo tanto el nivel comercial como domiciliario. Todas las partes involucradas en la cadena de producción, desde el productor al consumidor, comparten la responsabilidad de la inocuidad del alimento (Fuentes, 2012).

Los resultados obtenidos, se contradicen con la actividad antimicrobiana que ejercen la mayoría de las hierbas y especias contra diferentes bacterias, levaduras y mohos (Bor, 2016). Los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, etc.) son los principales fitoquímicos responsables de la actividad antioxidante en hierbas

y especias (Guldiken *et al.*, 2018). Además, pueden usarse potencialmente como conservantes de alimentos (Bor, 2016).

Adicionalmente, la parte principal de las especias que tienen actividad antimicrobiana es la fracción de aceite volátil. Las propiedades antimicrobianas de estas sustancias pueden surgir debido a su naturaleza hidrofóbica, que las favorece a partirse en los lípidos de la membrana y, en consecuencia, perturbar la integridad de la célula (Guldiken *et al.*, 2018).

Por otro lado, pruebas de calidad microbiana han revelado que las especias y las hierbas pueden mostrar altos niveles microbianos de hasta 10^8 UFC/g. Entre los microorganismos detectables también se encuentran especies patógenas que pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos. Los tres más prominentes son *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. y *Clostridium perfringens*; pero también se detectaron *Staphylococcus aureus* y otros patógenos alimentarios. Por lo tanto, los estudios sobre la supervivencia de microorganismos en los condimentos secos son relevantes para la evaluación microbiana de la inocuidad de los alimentos. Sin embargo, hasta ahora solo se dispone de datos limitados sobre la permanencia de los microorganismos en alimentos con bajo contenido de humedad y valores de actividad del agua inferiores a 0,85 (Thanh y Frentzel, 2018).

Respecto al análisis realizado se debe mencionar la hierba boldo, la cual presentó el menor contenido microbiano, lo cual radica en sus componentes activos, presentes en sus hojas y corteza, siendo el principal de ellos el alcaloide conocido como boldina (Benedetti y Barros, 2011).

En la literatura se han demostrado efectos de la boldina contra microorganismos, como *Trypanosoma cruzi*, cuya toxicidad puede ser atribuida a su poder antioxidante, la que actuaría como un bloqueador a nivel mitocondrial en el transporte de electrones (Godoy, 2002). También se ha reportado que las hojas de boldo contienen aceite esencial en concentraciones entre 1,5 y 2,4 ml/100g, el cual posee actividad antimicrobiana y antifúngica (INFOR, 2009), incluso a bajas concentraciones, sobre organismos tales como *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus* sp., *Candida* sp.

(Benedetti y Barros, 2011). Esto se avala por Mazutti *et al.*, (2008) documentando sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de los extractos de hojas de boldo sobre once bacterias gram-positivas y gram-negativas e informando sobre la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos de boldo, contra algunos agentes como *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*.

En relación a la hierba menta, sus hojas son bastante higroscópicas y susceptibles a la contaminación, especialmente por hongos, por lo que el secado rápido es esencial después de la cosecha, así como el riguroso control de las condiciones externas (temperatura y humedad) en todas las etapas de producción y almacenamiento, para minimizar la posibilidad de una contaminación secundaria mayor. Esto coincide con los resultados de investigaciones de menta en plantaciones en Serbia y Europa, donde se observó que casi todas las muestras estaban contaminadas con hongos y bacterias aerobias mesófilas, encontrando con frecuencia bacterias coliformes y *E. coli* (Stević *et al.*, 2012).

En estudios previos, varias infusiones de hierbas (manzanilla, crisantemo, lúpulo, jazmín, mejorana, menta y tomillo) fueron analizadas para detectar la contaminación por hongos y la presencia de bacterias aerobias mesófilas. Los resultados obtenidos mostraron que los recuentos de hongos alcanzaron niveles tan altos como $5,8 \times 10^5$ UFC/g. Por otra parte, las bacterias aerobias mesófilas estuvieron presentes en todas las infusiones de hierbas analizadas, superando valores de $1,0 \times 10^6$ UFC/g, siendo los mayores recuentos observados en hierba menta con un contenido de $1,2 \times 10^7$ UFC/g (Tournas y Katsoudas, 2008). En relación al estudio realizado se manifestó de igual forma que menta en condición deshidratada e infusión obtuvo los mayores recuentos de aerobios mesófilos en marca C y D, superando valores del orden de 10^5 UFC/g.

En otro estudio, muestras de infusión de manzanilla (*Matricaria recutita* L.) estaban contaminadas con esporas de *C. botulinum*, estando presentes en mayor cantidad en la hierba vendida a granel que las vendidas en bolsitas individuales. También se han

encontrado en hierbas esporas de *C. perfringens* y *Bacillus cereus* (superiores a 10^3 UFC/g) (Kosalec *et al.*, 2009).

Una prueba de la calidad microbiológica efectuada en hierba menta, demostró que los hongos más abundantes eran del género *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium* (*F. semitectum*, *F. subglutinans*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. equiseti*), siendo este último más significativo, provocando daños comerciales graves que afectaban a esta hierba (Stević *et al.*, 2012).

Una encuesta de contaminación microbiológica de flores de manzanilla secas indicó la presencia de bacterias termófilas hasta un nivel de 10^4 UFC/g (Katuščin-Ražem, 1983).

5.5. Comparación del contenido microbiano en diferentes condiciones de análisis.

5.5.1. RAM en condición de muestra deshidratada e infusión.

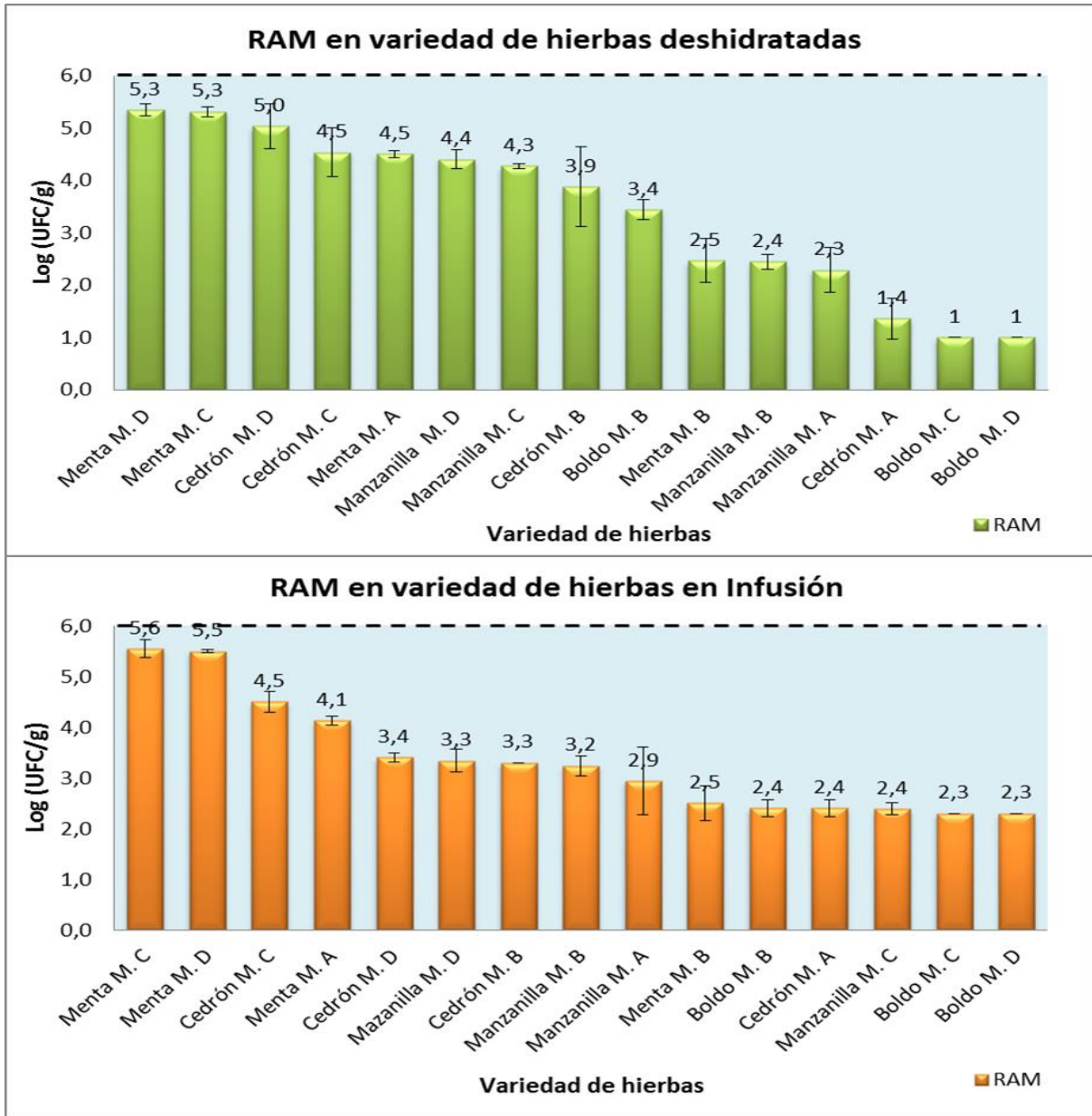


Figura 10. Contenido aerobios mesófilos en variedad de hierbas en condición deshidratada e infusión.

La **Figura 10** representa y compara el contenido de bacterias aerobias mesófilas en variedad de hierbas deshidratadas e infusión. Se refleja en el gráfico superior que las hierbas menta Marca D y C obtuvieron el mayor contenido de aerobios mesófilos

($2,3 \times 10^5$ UFC/g y $2,1 \times 10^5$ UFC/g respectivamente), y el menor valor lo presentó la hierba boldo Marca C y D ($< 1,0 \times 10^1$ UFC/g). Respecto al gráfico inferior se aprecia que las hierbas en infusión que presentaron una mayor concentración de microorganismos fueron de igual forma la hierba menta Marca C y D ($3,8 \times 10^5$ UFC/g y $3,1 \times 10^5$ UFC/g respectivamente), y las que obtuvieron menor contaminación fueron también de igual manera las hierbas boldo Marca C y D ($< 2,0 \times 10^2$ UFC/g). Sin embargo, esta situación no fue igual en todos los casos.

5.5.2. Enterobacterias en condición de muestra deshidratada e infusión.

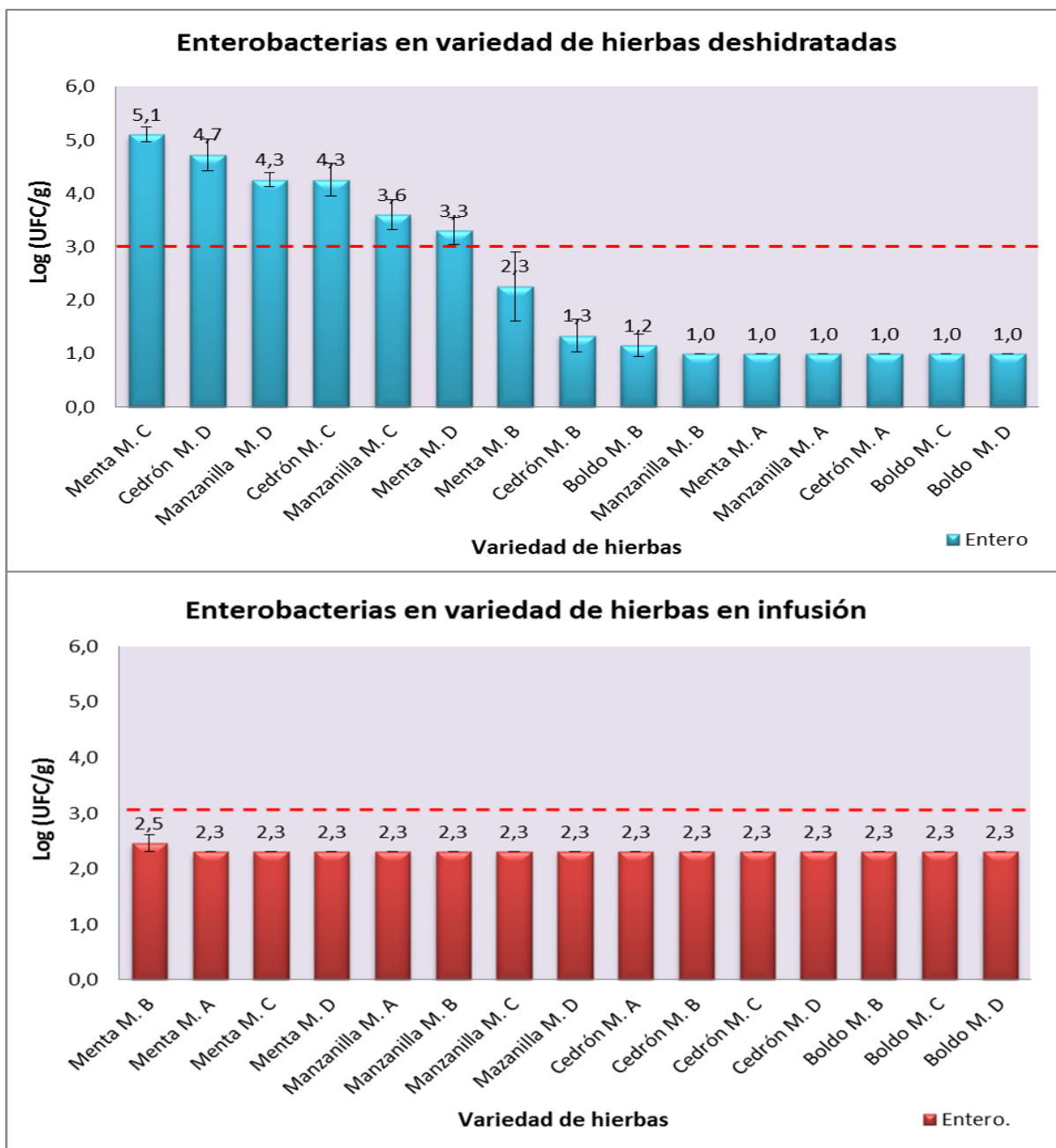


Figura 11. Contenido enterobacterias en variedad de hierbas en condición deshidratada e infusión.

Es posible observar en la **Figura 11**, que el mayor recuento de enterobacterias en las hierbas en condición deshidratada, lo obtuvo la hierba menta Marca C ($1,2 \times 10^5$ UFC/g) y la hierba cedrón Marca D ($6,9 \times 10^4$ UFC/g). Los menores niveles de contaminación lo obtuvieron la hierba menta, manzanilla y cedrón Marca A, manzanilla Marca B, y boldo Marca C y D ($<1,0 \times 10^1$ UFC/g). En relación al contenido de enterobacterias en condición de muestra en infusión, la que presentó un mayor contenido microbiano (levemente), fue la menta Marca B ($3,0 \times 10^2$ UFC/g), todas las demás muestras presentaron el menor valor detectable ($<2,0 \times 10^2$ UFC/g).

5.6. Análisis del contenido microbiano en hierbas para infusión, en diferentes condiciones de análisis (muestra deshidratada e infusión)

De acuerdo a los resultados obtenidos, se evidenció en la mayoría de los casos un contenido superior de aerobios mesófilos en la hierba en infusión que en estado deshidratado, lo cual no fue un resultado esperado, pues se sospechaba que al aplicar agua hirviendo muchos microorganismos se destruirían. Sin embargo, en estudios realizados con agua caliente para ver la efectividad en la eliminación o reducción de microorganismos, se concluyó que la temperatura del agua no muestra ningún efecto sobre la reducción bacteriana transitoria o residente (Michaels *et al.*, 2002).

Estudios similares en hierbas aromáticas, demuestran que al preparar infusiones mediante ebullición (25 g de muestra en 225 ml de agua en ebullición/ durante 1, 2 y 3 min), se asegura una disminución importante en la carga microbiológica. No obstante, esto no lo demuestran aquellas infusiones que son preparadas por el método convencional (25 g de muestra en 225 ml de agua a 60°C /durante 1, 2 y 3 min) o en horno de microondas (25 g de muestra en 225 ml de agua/ 100% de poder/ durante 1, 2 y 3 min), donde los niveles de bacterias disminuyen, pero no lo suficiente para alcanzar valores aceptables, obteniendo por preparación convencional una disminución en el número de bacterias de sólo 1 ciclo logarítmico, después de 3 min de tratamiento ($1,0 \times 10^5$ UFC/ml). Respecto a la supervivencia de

bacterias en infusiones elaboradas en microondas, se nota un descenso de 2 ciclos logarítmicos en el recuento total aerobio a 1 min de tratamiento ($1,0 \times 10^4$ UFC/ml), seguido por un aumento en la población en los minutos subsiguientes, llegando a niveles superiores a los iniciales ($1,0 \times 10^5$ UFC/ml). Al analizar la supervivencia en infusiones elaboradas por ebullición, durante 1 min de tratamiento se observa un descenso de 3 ciclos logaritmos en el recuento total ($1,0 \times 10^3$ UFC/ml), seguido por la desaparición total de bacterias después de 2 min del tratamiento térmico. Esto no concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. No obstante, se debe considerar que el tratamiento térmico podría favorecer levemente el aumento en el número de microorganismo, debido a la germinación de esporas sobrevivientes (Arias *et al.*, 1999).

En esta investigación, aquellas hierbas que presentaron una disminución de bacterias aerobias mesófilas al añadir agua hirviendo, fueron la hierba menta Marca A, la hierba boldo y cedrón Marca B, la hierba manzanilla y cedrón Marca C, la hierba manzanilla y cedrón Marca D. Se observa que hubo una similitud en lo obtenido para las hierbas expendio a granel, lo cual puede estar relacionado con el contenido microbiano que posee la hierba, o en función del origen, la pureza y las propiedades que la caracterizan.

En relación al mayor contenido microbiano en las hierbas restantes en estado de infusión, los resultados obtenidos se podrían justificar debido al desarrollo de microorganismos termófilos, como es el caso de las bacterias del género *Legionella* conformado por al menos 42 especies, siendo la temperatura caliente (hasta los 70°C) favorable y propicia para su crecimiento, encontrándose en tuberías de agua caliente, aire acondicionado, spa, etc. (EOZ, 2017). Además, otros microorganismos que se han identificados en infusiones de hierbas, incluye *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Omogbai y Ikenebomeh, 2013).

En un estudio de Wilson *et al.*, (2004), se evaluó la calidad microbiológica del hinojo, la manzanilla, la menta y el té de frutas. Estas hierbas se prepararon a 90°C durante

5 min, los resultados evidenciaron que todas las infusiones estaban contaminadas con especies bacterianas gram-negativas no fermentativas y bacterias formadoras de esporas (mayor en infusiones de manzanilla y menta). La alta temperatura disminuyó la cantidad de hongos en las infusiones. Sin embargo, los microbios patógenos pudieron sobrevivir a 90°C durante un tiempo breve. Además, se evidenció un crecimiento significativo (10^3 UFC/ml a 10^5 UFC/ml) de la especie de *A. baumannii*, en infusión de manzanilla, la cual se dedujo provenía del agua del grifo.

La presencia y gran número de bacterias puede ser explicado por el hecho de que algunos organismos, tales como *Bacillus* y *Clostridium* spp. producen esporas que son resistentes al procesamiento severo, elevado calor y condiciones secas. Por lo tanto, pueden sobrevivir durante mucho tiempo en el producto en estado latente y sobrevivir a la inmersión en agua hirviendo (Tournas y Katsoudas, 2008). Además, si no se aplicaron condiciones higiénicas adecuadas y buenas prácticas de fabricación (GMP), parte de la carga bacteriana puede provenir del personal que maneja los materiales de hierbas después del procesamiento, de esta manera microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* pueden transferirse a las hierbas durante su procesamiento (Omogbai y Ikenebomeh, 2013).

Para las industrias de tratamiento de alimentos, la contaminación de las especias por esporas bacterianas resistentes al calor es motivo de especial preocupación, ya que son causantes del deterioro y putrefacción de los alimentos. La destrucción de las esporas bacterianas termodúricas, introducidas en los alimentos por medio de los condimentos y de hierbas, suele requerir un termotratamiento drástico, que no asegura la estabilidad microbiológica de almacenamiento sino a costa de una reducción sustancial de la calidad nutritiva y organoléptica del producto. Todos estos problemas son un estímulo en los intentos por reducir las cargas de microorganismos potenciales de las especias y hierbas mediante un adecuado tratamiento de descontaminación (OIEA, 1985).

En la tabla 6 se presenta un resumen de todos los resultados obtenidos en variedades de hierbas para infusión, especificando la existencia de diferencias significativas y el incumplimiento de la legislación Vigente, Nacional e Internacional.

Tabla 6. Compendio de resultados de análisis realizados a hierbas para infusiones de distinta marca, en condición deshidratada e infusión.

Tipo	Condición	Marca	Recuento Aerobios mesófilos UFC/g	Recuento Enterobacterias UFC/g
Menta	Hierba deshidratada	Marca A (Oe, Me)	$(3,2 \pm 0,5) \times 10^4$ Ee	$(<1,0 \pm 0,0) \times 10^1$ Ee
Manzanilla			$(2,8 \pm 2,9) \times 10^2$ Ge	$(<1,0 \pm 0,0) \times 10^1$ Ge
Cedrón			$(3,0 \pm 2,6) \times 10^1$ He	$(<1,0 \pm 0,0) \times 10^1$ He
Menta	Infusión de hierba		$(1,4 \pm 0,3) \times 10^4$ Ee	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Ee
Manzanilla			$(1,7 \pm 2,2) \times 10^3$ Ge	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Ge
Cedrón			$(2,7 \pm 1,2) \times 10^2$ He	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ He
Menta	Hierba deshidratada	Marca B (Ir, Me)	$(3,8 \pm 2,6) \times 10^2$ Ee	$(2,0 \pm 1,0) \times 10^2$ Ee
Manzanilla			$(2,9 \pm 0,9) \times 10^2$ Ge	$(<1,0 \pm 0,0) \times 10^1$ Ge
Boldo			$(3,0 \pm 1,3) \times 10^3$ Te	$(1,3 \pm 6,0) \times 10^1$ Tc
Cedrón			$(1,4 \pm 1,7) \times 10^4$ He	$(2,5 \pm 1,5) \times 10^1$ He
Menta	Infusión de hierba		$(4,0 \pm 3,5) \times 10^2$ Ee	$(3,0 \pm 1,0) \times 10^2$ Ee
Manzanilla			$(1,9 \pm 0,9) \times 10^3$ Ge	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Ge
Boldo		$(2,7 \pm 1,2) \times 10^2$ Te	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Td	
Cedrón		$(2,0 \pm 0,0) \times 10^3$ He	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ He	
Menta	Hierba deshidratada	Marca C (Ss, Me)	$(2,1 \pm 0,5) \times 10^5$ Me	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^5$ Ee *
Manzanilla			$(1,9 \pm 0,2) \times 10^4$ Ge	$(4,4 \pm 1,9) \times 10^3$ Ge *
Boldo			$(<1,0 \pm 0,0) \times 10^1$ Te	$(<1,0 \pm 0,0) \times 10^1$ Tc
Cedrón			$(4,6 \pm 3,1) \times 10^4$ He	$(2,1 \pm 1,5) \times 10^4$ He *
Menta	Infusión de hierba		$(3,8 \pm 1,5) \times 10^5$ Me	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Ee
Manzanilla			$(2,5 \pm 0,7) \times 10^2$ Ge	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Ge
Boldo		$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Te	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Td	
Cedrón		$(3,4 \pm 1,4) \times 10^4$ He	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ He	
Menta	Hierba deshidratada	Marca D (Sd, Mi)	$(2,3 \pm 0,6) \times 10^5$ Me	$(2,2 \pm 1,2) \times 10^3$ Ee *
Manzanilla			$(2,7 \pm 1,2) \times 10^4$ Ge	$(1,8 \pm 0,6) \times 10^4$ Ge *
Boldo			$(<1,0 \pm 0,0) \times 10^1$ Te	$(<1,0 \pm 0,0) \times 10^1$ Tc
Cedrón			$(1,3 \pm 0,8) \times 10^5$ He	$(6,9 \pm 5,1) \times 10^4$ He *
Menta	Infusión de hierba		$(3,1 \pm 0,2) \times 10^5$ Me	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Ee
Manzanilla			$(2,4 \pm 1,4) \times 10^3$ Ge	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Ge
Boldo		$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Te	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ Td	
Cedrón		$(2,6 \pm 0,5) \times 10^3$ He	$(<2,0 \pm 0,0) \times 10^2$ He	

Ir: Irradiación (10 KGy); Oe: Óxido de etileno (27-37°C, 5 h); Ss: Secado al sol (30-40°C, 2-3 d); Sd: Secado desconocido.

Me: Mercado establecido; Mi: Mercado informal.

Letras mayúsculas iguales (E,G,H,T,M) en una misma columna indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre muestras de hierbas de distinta Marca, con un nivel de confianza del 95% por ANOVA Multifactorial (*Valor-P* >0,05).

Letras minúsculas iguales (e,c,d) en una misma columna indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas en condición de análisis (deshidratada e infusión), con un nivel de confianza del 95% por ANOVA Multifactorial (*Valor-P* >0,05).

* Incumplimiento Legislación Nacional para Enterobacterias.

Es posible observar en la **tabla 6** el total de resultados de RAM y Enterobacterias obtenidos para cada tipo de hierba analizada, con la marca correspondiente y la condición de la muestra para su análisis.

Con respecto al recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias, se aprecia un contenido relativo entre cada muestra de hierba analizada, obteniendo una contaminación que varía desde 10^1 hasta 10^5 UFC/g lo cual indica la poca uniformidad que existe entre el tipo de hierba y el tratamiento al que han sido sometidas.

En relación a los precios de las distintas hierbas en el mercado establecido e informal (**Anexo 5**), es posible observar que aquellas hierbas que fueron adquiridas en el mercado establecido presentaron un mayor precio que aquellas que se compraron en el mercado informal, lo que era esperable ya que éstas deben pagar costos fijos en el local dónde son vendidas, además de varios impuestos, lo cual eleva su valor. No obstante, dentro de las hierbas adquiridas en el mercado establecido se generó una incongruencia, debido a que las hierbas Marca C (las cuales manifestaron una alta contaminación) poseen un mayor precio que las hierbas Marca B las que fueron tratadas con energía ionizante, lo que puede ser explicado ya que éstas hierbas son vendidas como un producto orgánico lo cual le otorga un valor agregado, siendo consideradas de “alta calidad” y por ello su precio es más elevado.

5.7. Comparación y análisis de resultados obtenidos para hierbas tratadas con energía ionizante y aquellas tratadas con óxido de etileno.

Se debe recordar que la variedad de hierbas Marca A fueron tratadas con óxido de etileno y la variedad de hierbas Marca B fueron tratadas con energía ionizante. Respecto a los resultados obtenidos, se aprecia que en general el contenido de aerobios mesófilos fue mayor en algunas muestras Marca A, observando valores

máximos del orden de 10^4 UFC/g (hierba menta en condición deshidratada e infusión), en relación a muestras Marca B, que obtuvo en sólo una ocasión el valor máximo de 10^4 UFC/g (hierba cedrón en condición deshidratada). Respecto al contenido general de enterobacterias ambas Marcas entregaron valores bajos (10^1 - 10^2 UFC/g). No obstante, en esta categoría la marca A presentó un menor contenido microbiano.

Generalmente, cuando ciertos alimentos resultan importantes para la epidemiología de enfermedades transmitidas por los alimentos, se procede a la descontaminación/desinfección mediante irradiación. En el caso de las hierbas Marca B tratadas con irradiación, el producto obtenido presentó una contaminación admisible, lo cual garantiza que estas hierbas están libres de determinados parásitos y microorganismos patógenos (Loaharanu, 2001).

Además, la irradiación se utiliza como alternativa cuarentenaria contra plagas e insectos, reemplazando tratamientos costosos que alteran las características intrínsecas del producto o fumigantes químicos, los cuales son nocivos y perjudiciales para la salud y el medioambiente (ECI, 2009).

La aplicación de óxido de etileno, es un método frecuentemente usado para la descontaminación de especias y hierbas, como fue en el caso de las muestras Marca A. Aunque el óxido de etileno es un agente antimicrobiano relativamente eficaz, la fumigación es un procedimiento discontinuo, por lo que requiere mucho tiempo, y presenta problemas de uniformidad en la descontaminación, lo que requiere una compleja vigilancia del proceso. No obstante, el principal problema del tratamiento con óxido de etileno es el aspecto toxicológico. Sin embargo, estos residuos de óxido de etileno absorbido disminuyen constantemente durante el almacenamiento, pero ello se debe corrientemente más a ulteriores reacciones químicas, que a la pérdida gradual de gas. Por esta razón, el fumigante representa un importante riesgo profesional para la salud de las personas que manipulan el óxido de etileno en la planta, y la presencia de residuos en las especias y hierbas tratadas da origen a recelos de orden toxicológico (OIEA, 1985).

En un estudio realizado, se evaluó la calidad microbiológica de especias y hierbas, las cuales fueron contaminadas con *Salmonella* y expuestas a un tratamiento de fumigación con óxido de etileno, los resultados demostraron que la aplicación de ETO (ethylene oxide) destruyó la *Salmonella* y redujo la carga total de microorganismos. En el recuento de aerobios mesófilos se obtuvo $5,0 \times 10^5 - 1,8 \times 10^6$ UFC/g, y post-fumigación se obtuvo un recuento de $< 1,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ UFC/g, en el caso de Hongos y levaduras, el rango de pre-fumigación fue de $8,0 \times 10^3 - 3,3 \times 10^5$ UFC/g, y post-fumigación se obtuvo un recuento de $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g. No se detectó coliformes, *E. coli* y *C. perfringens* después de la fumigación. Sin embargo, se observó presencia de *B. cereus* en números bajos, que demostraron que el efecto de ETO en las esporas no es tan eficaz como en las células vegetativas. Por ello el tratamiento con ETO actualmente se utiliza para lograr una reducción general del 90% en la población bacteriana de muchas especias y hierbas (Pafumi, 1986).

Similares análisis fueron realizados por Torres *et al.*, (2007), quienes evaluaron la calidad microbiológica de plantas medicinales y establecieron si el proceso de esterilización con óxido de etileno tenía un efecto eficaz sobre la materia prima, propuesta a evaluar. Los productos analizados fueron boldo, caléndula, sen, fucus y spirulina, previo al proceso con ETO, el contenido de aerobios mesófilos estuvo en el rango de $3,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^5$ UFC/g, en el caso de hongos y levaduras fue de $6,0 \times 10^2 - 9,0 \times 10^5$ UFC/g. Los resultados obtenidos posterior a la esterilización con ETO fueron $< 1,0 \times 10^2 - 3,3 \times 10^3$ UFC/g para aerobios mesófilos y $< 1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ UFC/g para hongos y levaduras.

En otra investigación realizada, se compararon los efectos de los tratamientos con Óxido de etileno e Irradiación Gamma en especias seleccionadas. Los resultados obtenidos evidenciaron que la irradiación gamma como tratamiento desinfectante, obtuvo una mayor eficacia en la reducción microbiana de acuerdo al tratamiento con óxido de etileno. Las especias que no fueron sometidas a un tratamiento de reducción microbiana, tuvieron un contenido bacteriano total de $3,26 \times 10^4 - 9,86 \times 10^6$ UFC/g, un contenido de bacterias termofílicas de $9,0 \times 10^2 - 1,58 \times 10^6$ UFC/g, y de esporas aeróbicas de $< 1,0 \times 10^2 - 6,34 \times 10^4$ UFC/g. Aquellas tratadas con óxido de

etileno obtuvieron un contenido bacteriano total de $<1,0 \times 10^2$ - $1,45 \times 10^4$ UFC/g, de bacterias termofílicas $<1,0 \times 10^2$ - $4,3 \times 10^2$ UFC/g y de esporas aeróbicas de $<1,0 \times 10^2$ UFC/g. Finalmente el tratamiento mediante irradiación gamma en las muestras de especias, manifestó una completa ausencia en el contenido microbiano en todos los casos. En este estudio se concluyó que la irradiación posee una mayor eficacia en la eliminación de microorganismos en comparación con la aplicación de óxido de etileno, el cual no destruye la totalidad de microorganismos y además puede generar subproductos tóxicos y efectos indeseables en parámetros tales como sabor y color de ciertos productos (Vajdi y Pereira, 1973).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede deducir que el método empleado para disminuir la contaminación microbiana, aplicado preliminarmente en las hierbas para infusión fue efectivo en ambos casos, debido a que los valores conseguidos fueron relativamente bajos, cumpliendo con la reglamentación y garantizando un producto inocuo para el consumidor (en términos microbiológicos). Sin embargo, las ventajas e implicancias a la salud y al medio ambiente, varían entre cada método, siendo preferible de acuerdo a la bibliografía revisada, la aplicación de irradiación que de óxido de etileno.

5.8. Análisis y comparación de resultados microbiológicos, considerando el origen y forma de comercialización del producto.

Al comparar los resultados microbiológicos obtenidos entre la Marca A y la Marca B (véase la **Tabla 6**), se logra observar que respecto al contenido de enterobacterias, la Marca A obtuvo un escaso contenido microbiano en todas las hierbas analizadas en estado deshidratado ($<1,0 \times 10^1$) e infusión ($<2,0 \times 10^2$). La Marca B, por su lado desarrolló contenidos microbianos más elevados pero aun así bajos, cumpliendo con el rango permitido por la Legislación. De acuerdo al contenido de aerobios mesófilos, la marca A presentó valores más elevados del orden de 10^4 .

Estos resultados obtenidos son coherentes y esperables, debido a que fueron adquiridos en el mercado formal, y se “supone” que deben cumplir con normas y

fiscalizaciones estrictas respecto a calidad e inocuidad alimentaria. Sin embargo, esta situación no siempre se presenta así.

En relación a los resultados obtenidos en las hierbas Marca C, se aprecia en el contenido de enterobacterias un escaso desarrollo en la variedad de hierbas en infusión, sin embargo en las hierbas deshidratadas se evidencia un elevado contenido microbiano, en el caso de menta ($1,2 \times 10^5$ UFC/g), manzanilla ($4,4 \times 10^3$ UFC/g) y cedrón ($2,1 \times 10^4$ UFC/g). Con respecto al contenido de aerobios mesófilos también se evidenció un contenido similar en las hierbas menta, manzanilla y cedrón deshidratado, al igual que en menta y cedrón en infusión (10^4 y 10^5 UFC/g).

El resultado obtenido para hierba Marca C no fue del todo esperable, debido a que se adquirió en el mercado establecido, siendo catalogado como un producto de alta calidad, cultivado de manera orgánica y cumpliendo con requisitos sanitarios. No obstante, una información relevante es que no se le aplicó ningún tratamiento para disminuir la carga microbiana, lo cual es fundamental para tener más claridad y dilucidar la razón por la cual se encontró más contenido respecto a las variedades de hierbas Marcas A y B.

Al comparar las hierbas Marca D, se puede evidenciar de la misma forma la presencia de un elevado contenido de enterobacterias en las hierbas deshidratadas: menta ($2,2 \times 10^3$ UFC/g), manzanilla ($1,8 \times 10^4$ UFC/g) y cedrón ($6,9 \times 10^4$ UFC/g). Sin embargo, en la variedad de hierbas en infusión también se obtuvo una mínima contaminación microbiana. En relación al contenido de aerobios mesófilos, también los valores fueron similares en las mismas hierbas anteriormente expuestas, y en el caso de menta y cedrón en infusión.

Estas hierbas al ser comercializadas en el mercado informal, en lugares como la calle y de procedencia incierta, es comprensible la contaminación obtenida, e incluso sospechada con anterioridad, debido a que no se logró encontrar con certeza información relevante del origen de la hierba, la empresa y proceso por el cual se trató la hierba antes de su compra. Además, en ningún momento se tuvo seguridad de que el contenido de la hierba vendida a granel, fuese en estado puro, sin la adición o combinación de otras hierbas o partes de las mismas. Esto se corrobora

con la fisiología de la planta, ya que todas las partes de ésta (raíz, hoja, flor) poseen de forma natural un alto nivel de contaminación microbiana (10^8 UFC/g) lo cual puede ser el resultado de una recolección, secado, limpieza, transporte y almacenamiento inapropiado (Stević *et al.*, 2012).

Otra posible fuente de contaminación son los microorganismos del suelo, del aire y polvo depositado en plantas de procesamiento de hierbas (altamente contaminadas con bacterias), considerando además una contaminación que puede provenir de origen humano. También se puede haber generado una contaminación cruzada a partir de materiales como plásticos, vidrio y otros materiales que entran en contacto con hierbas aromáticas, en la línea de procesos (Kosalec *et al.*, 2009).

Los resultados presentados para variedad de hierbas Marca C y D, se avalan con lo descrito por Jerke *et al.*, (2009), que reporta que una mayor manipulación incluye un mayor contenido de polvo en la preparación del té en saquitos, responsable de la mayor magnitud de su contaminación bacteriana y fúngica. Lo cual es una variable a considerar en el envasado y comercialización de este tipo de productos.

Por otro lado, en una investigación realizada a hierbas para infusión (hierba de tomillo, hojas de menta, hierba de cola de caballo, hojas de ortiga, flor de saúco), se observó la presencia de contaminación con *Escherichia coli*, lo que puede haberse debido a la proximidad de los asentamientos y los animales que pueden contaminar las hierbas con la orina y las heces, o también a la falta de higiene de los trabajadores (Stević *et al.*, 2012).

Se conoce, que la conservación de las plantas medicinales y aromáticas se logra cuando el producto está seco, ya que los procesos fisiológicos y el crecimiento de microorganismos se detienen en ausencia de agua. Ya que la mayoría de los microorganismos necesitan valores de aw (actividad de agua) por encima de 0,96, pero algunas bacterias, hongos y levaduras pueden crecer a valores de aw tan bajos como 0,60 (Benedetti y Barros, 2011). Debido a ello, se puede considerar que las materias primas evaluadas no hayan tenido un proceso de secado adecuado, lo cual permitió que algunos microorganismos sobrevivieran y posteriormente se detectaran mediante los análisis microbiológicos realizados (Torres *et al.*, 2007).

Una buena medida de control para prevenir la contaminación microbiana es el secado de hierbas a altas temperaturas (100°C) lo cual se ha demostrado, puede disminuir el contenido microbiano de aerobios totales desde $4,6 \times 10^8$ UFC/g a $1,5 \times 10^5$ UFC/g (Kosalec *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Jerke *et al.*, (2009) se determinó la calidad microbiológica del té negro comercializado en hebras y en saquitos. Se estudiaron 100 muestras y se evaluaron bacterias aerobias mesófilas totales, obteniendo para el té negro en saquitos valores de aerobios mesófilos en el orden de 10^3 UFC/g y para el té en hebras valores de 10^2 UFC/g, lo cual no se evidenció en la investigación presentada, ya que las hierbas vendidas a granel presentaron mayor contaminación que aquellas comercializadas en bolsitas individuales.

Se debe considerar y tener precaución al ingerir plantas aromáticas, ya que no se conoce con certeza las condiciones en que se producen y comercializan, así como el número de hectáreas dedicadas al cultivo de éstas. De hecho en Europa, varios movimientos de consumidores promueven una regulación de estas plantas, porque aún hay gente que piensa, de manera equivocada, que las plantas medicinales son inocuas (Rodríguez, 2016). No obstante, como se ha visto en los productos a granel, esta contaminación elevada puede dar indicio de otro tipo de microorganismos que pueden afectar a la salud, si no han pasado por medidas fitosanitarias adecuadas. Por ello se debe tener en consideración los factores de proceso, tratamiento microbiano, origen de expendio, cumplimiento de la legislación, etc.

Precisamente, esta información se reafirma, ya que en un estudio realizado sobre ocurrencia y diversidad de *Bacillus cereus* y mohos en especias y hierbas, se determinó que los lugares de venta, las técnicas de procesamiento y los países de origen influyen en la concentración de microorganismos en estos productos (Fogele *et al.*, 2018), por ello al considerar varios factores como los mencionados anteriormente, la contaminación microbiológica obtenida puede ser diversa e impredecible.

La prevención de la contaminación microbiana en hierbas y especias secas, radica en la aplicación de buenas prácticas de higiene durante el cultivo, la cosecha y el

procesamiento desde la granja hasta la mesa, y la descontaminación efectiva. Además, lo fundamental de las prácticas correctas de los consumidores (Sagoo *et al.*, 2009).

Los resultados de esta investigación demuestran que todavía existen deficiencias en la calidad microbiológica en ciertas hierbas para infusión, por lo cual es importante desarrollar reglamentos más estrictos, que consideren varios factores, como la aplicación de un tratamiento desinfectante y la procedencia de la hierba, para que estos productos no representen un riesgo para la salud del consumidor.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el recuento de aerobios mesófilos estuvieron comprendidos dentro de los valores estipulados por la Legislación vigente internacional, considerando que el RSA no considera el recuento de bacterias aerobias mesófilas en hierbas para infusión. Respecto al contenido de enterobacterias, ciertas hierbas no cumplieron con lo exigido por el RSA y otras normas internacionales. Estas hierbas fueron menta ($1,2 \times 10^5$ UFC/g), manzanilla ($4,4 \times 10^3$ UFC/g) y cedrón ($2,1 \times 10^4$ UFC/g) en condición deshidratada Marca C, y asimismo, hierba menta ($2,2 \times 10^3$ UFC/g), manzanilla ($1,8 \times 10^4$ UFC/g) y cedrón ($6,9 \times 10^4$ UFC/g) en condición deshidratada Marca D.

Se evidenció que las hierbas Marca C y D presentaron mayor contenido de aerobios mesófilos y enterobacterias que las hierbas Marca A y B.

La hierba boldo Marca C y D manifestó la mayor calidad microbiológica, debido a la obtención del menor contenido microbiano. Al contrario, la hierba menta Marca C obtuvo una calidad microbiológica inferior, debido a la obtención del mayor contenido microbiano.

Respecto a la Marca, aquella que demostró la mayor calidad microbiológica, fue la Marca A, debido a que ésta obtuvo dos tipos de hierbas con bajo desarrollo microbiano (manzanilla y cedrón). La Marca D obtuvo la menor calidad microbiológica, lo cual se evidenció en el elevado contenido microbiano en hierba manzanilla y cedrón.

La aplicación de irradiación así como la utilización de óxido de etileno fueron efectivos en la desinfección microbiana, lo cual se evidenció en hierbas Marca A y Marca B, en comparación con hierbas Marca C y D las cuales no fueron sometidas a tratamiento alguno.

En algunos casos particulares (menta Marca A, manzanilla Marca C y D, Boldo Marca B, Cedrón Marca B y D) se apreció la disminución en la contaminación microbiana al añadir agua hirviendo. Sin embargo, en la mayoría de los casos

aumentó la contaminación en estado de infusión, esto pudo deberse a la posible presencia de microorganismos termófilos.

En el análisis estadístico realizado, sólo se encontró diferencias significativas en el contenido de aerobios mesófilos en hierbas menta de distinta marca y en el contenido de enterobacterias en hierbas boldo en condición deshidratada e infusión, con un nivel de confianza del 95%.

Las hierbas Marca A, Marca B y Marca C adquiridas en el mercado establecido presentaron un mayor precio, que las adquiridas en el mercado informal y una consecuente menor contaminación, sin considerar el tratamiento aplicado. Además las hierbas expandidas a granel presentaron una mayor contaminación respecto a las comercializadas en envases individuales.

En relación a los resultados obtenidos se evidenció que factores como la procedencia, el tratamiento de desinfección aplicado, el tipo de hierba, la presentación y lugar de compra influyen notoriamente en la calidad microbiológica en las hierbas para infusión.

7. Bibliografía

- Arias, M., Chaves, C., Alfaro, L., 1999. Análisis microbiológico de algunas infusiones de hierbas medicinales. *Revista Biomédica* 10(1):1-6.
- Banach, J.L. 2016. European alerting and monitoring data as inputs for the risk assessment of microbiological and chemical hazards in spices and herbs. *Food Control* 69: 237-249.
- Benedetti y Barros. 2011. Boldo (*Peumus boldus* Mol.) Rescate de un Patrimonio Forestal Chileno Manejo Sustentable y Valorización de sus Productos.
- BOE. Boletín Oficial del Estado Legislación Consolidada. Real Decreto 1354/1983. Madrid, 1983. 7p.
- Bor, Tarik. Chapter 26 – Antimicrobials from herbs, spices, and plants. *Fruits, Vegetables, and Herbs*. Pages 551-578, 2016.
- Capital. La hora del té (2007). [en línea] <<http://www.capital.cl/poder/2007/02/23/4867/la-hora-del-te/>> [consulta: 8 mayo 2018].
- CODEX ALIMENTARIUS. Código de Prácticas de Higiene para Especies y Plantas Aromáticas Desecadas. CAC/RCP 42-1995. 18p.
- CODEX ALIMENTARIUS. Código de prácticas para el tratamiento de los alimentos por irradiación. CAC/RCP 19-1979. 32p.
- Código Alimentario Argentino. Decreto N° 2126/71. Artículo 1163. Ministerio de Salud. 2010.
- EOZ, instituto de tecnologías rurales a.c. (2017). Bacterias en el agua y sus efectos en la salud de las personas [en línea] <<https://www.agualimpia.mx/blogs/news/bacterias-en-el-agua-y-sus-efectos-en-la-salud-de-las-personas-enfermedades-propagadas-por-el-agua>> [consulta: 5 junio 2018].
- Esteve, S., LLoréns, M., Martínez, C. Los recursos naturales de la región de Murcia: un análisis interdisciplinar. Murcia, EDITUM, 2003. 431p.

- Evisos. Venta de productos naturales Santa Bernardita [en línea] <<https://santiago.evisos.cl/venta-de-productos-naturales-santa-bernardita-id-382935>> [consulta: 5 mayo 2018].
- FIA, Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura. Resultados y Lecciones en Plantas Medicinales y Aromáticas, Proyectos de Innovación en Regiones V, VII, VIII y X. 2008, 38p.
- Fogle, B., Granta, R., Valcina, O., Berzins, A. 2018. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control* 83: 69-74.
- Fuentes, R., Olea, A., Díaz, J., Vaquero, A. y García., M. 2012. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista Chilena de Infectología* 29(5): 504-510.
- Godoy, C. 2002. Estudio de la capacidad antioxidante de extractos de boldo obtenidos con tecnologías tradicionales y de punta. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias de la Ingeniería. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 39 p.
- Guldiken, B., Ozkan, G., Catalkaya, G., Duygu, F., Ekin, I., Capanoglu, E. 2018. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. *Food and Chemical Toxicology* 119 (7): 37-49.
- Hidalgo, R., Castellanos, V., Chiroles, S., Villavicencio, O. 2002. Dispositivos médicos de uso único reprocessados por esterilización química mediante óxido de etileno. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 40(2): 89-94.
- ICEX. EL consumo de té se dispara en Chile. [en línea] Estrategia Online Chile, Julio 2009. <<http://www.icex.es/icex/es/navegacion-principal/todos-nuestros-servicios/informacion-de-mercados/paises/navegacion-principal/noticias/4237341.html?idPais=CL&null>> [consulta: 13 abril 2017].
- INFOR, 2009. Sistematización Silvícola, Técnica y Comercial de Boldo (*Peumus boldus* Mol) en Chile.
- INNa. NCh2659.Of2002. Productos hidrobiológicos – Determinación de microorganismos aerobios mesófilos – Técnica de recuento en placa a 35°C.
- INNb. NCh2676.Of2002. Productos hidrobiológicos – Determinación de enterobacterias sin resucitación (ufc/g y NMP/g).

- Jacas, M., Sánchez, E., García, N., Piña, D. 2011. Apósito biológico esterilizado con gas óxido de etileno. *Ortopedia y Traumatología* 25(2):128-135.
- Jerke, J., Bargardi, S., Medvedeff, M., Gonzales, E. 2009. Calidad microbiológica de té negro en dos formas comerciales: en hebras y en saquitos. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (12):52-57.
- Katušin-Ražem, B., Ražem, D., Dvornik, I., Matic, S. 1983. Radiation treatment of herb tea for the reduction of microbial contamination (*Flores chamomillae*). *Radiation Physics and Chemistry* 22(3-5):707-713.
- Kosalec, I., Cvek, J., Tomić, S. 2009. Contaminants of Medicinal Herbs and Herbal Products. *Arh Hig Rada Toksikol* 60:485-501.
- Loaharanu, Paisan. Creciente Demanda de Alimentos Inocuos, La Tecnología de Las Radiaciones Constituye una Respuesta Oportuna. *Boletín Del OIEA*, 2001.
- López, L. 2002. Formas de administración más habituales de plantas medicinales. *Elsevier*, 21(2): 11-161.
- Lora, M^a Isabel. 2007. La botica de Sor Isabel: Los remedios naturales de las monjas dominicanas [en línea] <https://books.google.cl/books?id=AdssDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=principios+activos+de+hierbas+para+infusi%C3%B3n&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi03aP1x5_AhWlipAKHdyFBccQ6AEIRDAF#v=onepage&q&f=false> [consulta: 25 abril 2018].
- Mazutti, M., Mossi, A. J., Cansian, R.L., Corazza, M., Dariva, C., Oliveira, V. 2008. Chemical profile and antimicrobial activity of Boldo (*Peumus boldus Molina*) extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 25(2):427-434.
- Meneses, E. 2013. Transformación de plantas aromáticas en infusiones. Trabajo de grado para optar el título de Administrador de Empresas Agropecuarias. Caldas-Antioquia, Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias. 144 p.
- MHT, Medicamentos Herbarios Tradicionales 103 especies vegetales. Santiago, 2009. 232 p.

- Michaels, B., Gangar, V., Schultz, A., Arenas, M., Curiale, M., Ayers, T., Paulson, D. 2002. Water temperature as a factor in handwashing efficacy. *Food Service Technology Banner*, 2(3): 139-149.
- MINSAL, Listado de medicamentos herbarios tradicionales. Enero 2012, 54 p.
- MIPRO, Manufactured Imports and Investment Promotion Organization. *Guide to Food Import*, 2015. 36p.
- Muñoz, López F. *Plantas Medicinales y Aromáticas, Estudio, cultivo y procesado*. 4ª ed. Barcelona, Aedos, 2002. 343p.
- Nore, A. y Sánchez, P., 2008. Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™ 3M™ para el análisis de alimentos. Trabajo de Grado de Microbiólogo Industrial. Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 213 p.
- Norma Sanitaria que establece Los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para Los Alimentos y Bebidas de consumo humano. Decreto Supremo N° 007.98 SA. 24p.
- OIEA, Organismo Internacional de Energía Atómica. *La Irradiación de Alimentos en Latinoamérica*. IAEA-TECDOC-331. Viena, 1985. 236p.
- Omogbai, B. y Ikenebomeh, M. 2013. Microbiological Characteristics and Phytochemical Screening of Some Herbal Teas in Nigeria. *European Scientific Journal* 9(18):149-160.
- OMS. *Quality control methods for medicinal plant materials* World Health Organization Geneva, 1998, 122p.
- Pafumi, J. 1986. Assessment of the Microbiological Quality of Spices and Herbs. *Journal of Food Protection* 49(12): 958-963.
- Pamplona, Roger J. *Salud por las Plantas Medicinales*. Madrid, Safeliz, 2006. 387p.
- Prat, A. y Sanz, P. 1987. Aspectos toxicológicos de la exposición al óxido de etileno. *Revista de Saúde Pública* 21(6):523-528.
- ProChile. *Estudio de Mercado de Hierbas e Infusiones para el Mercado de Japón*, 2011, 18p.

- Proyecto IICA-GTZ “Orientación de la Investigación Agraria hacia el Desarrollo Alternativo”. Promoción y Comercio de Plantas Promisorias con Principios Activos Especiales de la Selva del Perú. Lima, Perú, 1999. 216p.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto N° 977/96. Artículos 452,459. Ministerio de Salud. República de Chile. 2011.
- Reglamento Técnico Centroamericano. Criterios Microbiológicos para La Inocuidad de Alimentos. RTCA 67.04.50:08. 2009. 36p.
- Rodríguez, A. (2016). Las hierbas medicinales pueden reducir el efecto de los fármacos [en línea] <<https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/de7en7/1/las-hierbas-medicinales-pueden-reducir-el-efecto-de-los-farmacos>> [consulta: 28 mayo 2018].
- Rojas Méndez, José. Plan de Negocios para la Importación de Té, Frutos y Plantas, Su Transformación y La Comercialización Final de Infusiones Gourmet Asiáticas-Andinas en Chile. Tesis (Grado de Magíster en Gestión y Dirección de Empresas). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2016. 93 h.
- Sagoo, S.K., Little, C.L., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K.A., Lauchlin, J., Threlfall, E.J. 2009. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology* 26(1):39-43.
- SERNAC, 2002. Hierbas Envasadas para Infusión: ¿Son tan buenas como dicen? (Agosto de 2002). [en línea] <<http://www.sernac.cl/43705/>> [Consulta: 10 abril 2017].
- Stević, T., Pavlović, S., Stanković, S., Šavikin, K. 2012. Pathogenic microorganisms of medicinal herbal drugs. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64 (1): 49-58.
- Thanh, M. D. y Frentzel, H. 2018. Tenacity of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in dried spices and herbs. *Food Control*. 83: 75-84.
- Torres, M., Arias, J., Guatibonza, F., Oliveros, A.I., Fernández, C. 2007. Análisis microbiológico de plantas medicinales con óxido de etileno. *Revista Cubana de*

Farmacía 41(2) http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152007000200008

- Tournas, V.H. y Katsoudas, E.J. 2008. Microbiological Quality of Various Medicinal Herbal Teas and Coffee Substitutes. *Microbiology Insights* 1: 47–55.
- Ulloa M. 2016. Enfermedades Transmitidas por los Alimentos en Chile: Agentes causantes y factores contribuyentes asociados a brotes ocurridos durante el año 2013. Tesis de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 63 p.
- Unilever. About Unilever [en línea] <<https://www.unilever.com/about/who-we-are/about-Unilever/>> [consulta: 15 mayo 2018].
- Vajdi, M. y Pereira, R.R. 1973. Comparative effects of ethylene oxide, gamma irradiation and microwave treatments on selected spices. *Journal of Food Science*. 38 (5): 893-895.
- Vega G., Los secretos de las plantas 50 plantas medicinales en su huerta. 3^a ed. Medellín, Secretos para contar, 2014. 200 p.
- Wilson, C., Dettenkofer, M., Jonas D, Daschner, F. 2004. Pathogen growth in herbal teas used in clinical settings: A possible source of nosocomial infection?. *Am J Infect Control* 32(2):117-9.

8. Anexos

Anexo 1: Preparación Infusión de hierba.

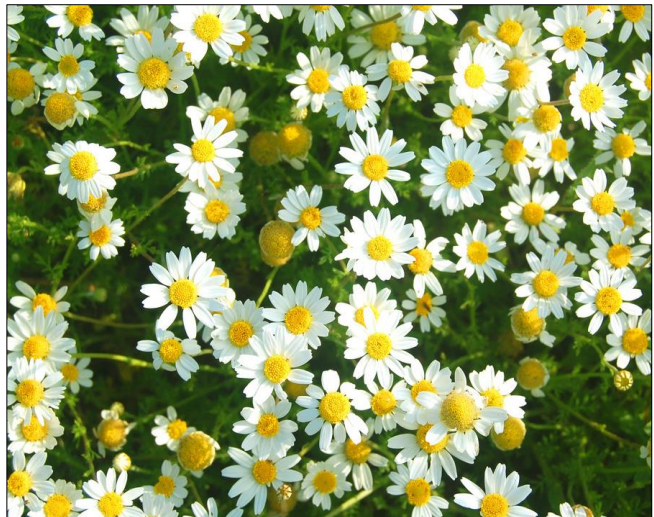


(Fuente: Lora, 2007)

Anexo 2: Hierbas para infusión utilizadas en esta investigación.



(Menta. Fuente: Vega, 2014)



(Manzanilla. Fuente: MHT, 2009)



(Boldo. Fuente: MHT, 2009)



(Cedrón. Fuente: Vega, 2014)

Anexo 3: Participación de mercado de bebidas calientes en Chile.



(Fuente: INFOR, 2009)

Anexo 4: ANOVA multifactorial para hierba menta, manzanilla, boldo y cedrón de distinta Marca y en condición de muestra deshidratada e infusión.

Análisis de Varianza para RAM - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra Menta	1,47807E11	3	4,9269E10	13,34	0,0306
B:Condición	6,72916E9	1	6,72916E9	1,82	0,2699
RESIDUOS	1,10828E10	3	3,69428E9		
TOTAL (CORREGIDO)	1,65619E11	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de RAM en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0,05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre RAM con un 95,0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para RAM por Muestra Menta

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra Menta	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
M/B	2	390,0	42978,4	X
M/A	2	23000,0	42978,4	X
M/D	2	270000,	42978,4	X
M/C	2	295000,	42978,4	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
M/A - M/B		22610,0	193431,
M/A - M/C	*	-272000,	193431,
M/A - M/D	*	-247000,	193431,
M/B - M/C	*	-294610,	193431,
M/B - M/D	*	-269610,	193431,

M/C - M/D		25000,0	193431,
-----------	--	---------	---------

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Análisis de Varianza para Enterobacterias - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra Menta	5,32638E9	3	1,77546E9	1,00	0,5004
B:Condición	1,84559E9	1	1,84559E9	1,04	0,3832
RESIDUOS	5,33246E9	3	1,77749E9		
TOTAL (CORREGIDO)	1,25044E10	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Enterobacterias en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Enterobacterias con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de Varianza para RAM - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra Manzanilla	2,73075E8	3	9,10252E7	0,98	0,5051
B:Condición	2,03213E8	1	2,03213E8	2,20	0,2349
RESIDUOS	2,77453E8	3	9,24842E7		
TOTAL (CORREGIDO)	7,53741E8	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de RAM en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre RAM con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de Varianza para Enterobacterias - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra Manzanilla	1,08848E8	3	3,62827E7	1,00	0,5000
B:Condición	5,8428E7	1	5,8428E7	1,61	0,2940
RESIDUOS	1,08848E8	3	3,62827E7		
TOTAL (CORREGIDO)	2,76124E8	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Enterobacterias en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Enterobacterias con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de Varianza para RAM - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra Boldo	3,1212E6	2	1,5606E6	1,10	0,4766
B:Condición	920417,	1	920417,	0,65	0,5054
RESIDUOS	2,84213E6	2	1,42107E6		
TOTAL (CORREGIDO)	6,88375E6	5			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de RAM en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre RAM con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de Varianza para Enterobacterias - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra Boldo	3,0	2	1,5	1,00	0,5000
B:Condición	53581,5	1	53581,5	35721,00	0,0000
RESIDUOS	3,0	2	1,5		
TOTAL (CORREGIDO)	53587,5	5			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Enterobacterias en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0,05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Enterobacterias con un 95,0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Enterobacterias por Condición

Método: 95,0 porcentaje LSD

Condición	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
D	3	11,0	0,707107	X
I	3	200,0	0,707107	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
D - I	*	-189,0	4,30265

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Análisis de Varianza para RAM - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra Cedrón	5,57002E9	3	1,85667E9	1,03	0,4903
B:Condición	2,85617E9	1	2,85617E9	1,59	0,2970
RESIDUOS	5,40324E9	3	1,80108E9		

TOTAL (CORREGIDO)	1,38294E10	7			
-------------------	------------	---	--	--	--

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de RAM en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre RAM con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de Varianza para Enterobacterias - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra Cedrón	1,58771E9	3	5,29238E8	1,00	0,5000
B:Condición	9,95361E8	1	9,95361E8	1,88	0,2638
RESIDUOS	1,58771E9	3	5,29238E8		
TOTAL (CORREGIDO)	4,17079E9	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Enterobacterias en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Enterobacterias con un 95,0% de nivel de confianza.

Anexo 5: Comparación de Precios y origen de Hierbas para infusión.

Hierba	Marca	Contenido	Expendio	Precio	Mercado
Menta	A	20 g	Envases individuales	\$ 939	Establecido
Manzanilla		20 g		\$ 939	
Cedrón		24 g		\$ 939	
Menta	B	20 g	Envases individuales	\$ 759	
Manzanilla		20 g		\$ 729	
Boldo		24 g		\$ 759	
Cedrón		26 g		\$ 729	
Menta	C	8 g	Granel	\$ 769	
Manzanilla		8 g		\$ 769	
Boldo		8 g		\$ 769	
Cedrón		8 g		\$ 769	
Menta	D	10 g	Granel	\$ 650	Informal
Manzanilla		10 g		\$ 650	
Boldo		10 g		\$ 650	
Cedrón		10 g		\$ 650	